



FACULTAD DE CIENCIAS.

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE ISG15 FRENTE AL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO.

Memoria presentada por Rubén González Sanz para optar
al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad
Autónoma de Madrid.

Madrid, marzo de 2016.



Instituto de Salud Carlos III



El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, bajo la dirección del Dr. Isidoro Martínez González.

“La mente que se abre a una nueva idea
jamás volverá a su tamaño original”

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS.

Por fin ha llegado el punto y final. Se cierra una etapa que para mí empezó realmente hace mucho más de cinco años, en el momento en el que decidí estudiar la carrera de biología. Se cierra una etapa y espero que empiece otra, siempre mejor, el esfuerzo ha sido grande y hay mucha gente que ha contribuido de alguna manera a que todo haya sido un poquito más fácil.

Poder empezar una tesis no fue una tarea fácil, quiero agradecer en primer lugar al Dr. Isidoro Martínez el que me abriera las puertas de su laboratorio y me haya permitido realizar este trabajo durante todos estos años. Quiero agradecer también al Dr. José Antonio Melero todas sus críticas constructivas sobre mi trabajo en los numerosos seminarios que hemos compartido y que me haya tratado como si casi perteneciera a su grupo.

A toda la gente del laboratorio de Biología Viral: Alfonsina, Tito, Laura, Olga, Concha, Blanca, Mónica, Teresa y Eduardo. En lo científico, gracias por haberme soportado en todos y cada uno de mis seminarios y por las aportaciones que habéis hecho con vuestros comentarios. Gracias por haberme “prestado” todos los equipos y reactivos que he necesitado durante todos estos años y por solventar cualquier duda que haya podido tener. Agradecer especialmente a Tito su ayuda con la mutagénesis dirigida y a Alfonsina que me haya aguantado tantas preguntas sobre cómo mejorar los western blot. En lo personal, gracias a todos por preocuparos por mí en los momentos difíciles y por haberme tratado tan bien en todo momento. A Alfonsina, Olga y Laura, gracias por haber dejado que os contara mis penas de vez en cuando. Laura, compañera de guerra, al final logramos el objetivo. Ha sido un verdadero placer conoceros.

Desde luego que nada habría sido igual sin mis compis del laboratorio, los que todavía están y los que se fueron ya hace algún tiempo: Mónica Ga., Amanda, Dani, Nines, Sonia, Mónica Gu., Elena, Amparo, Luz, Marta y Ana. No os podéis hacer a la idea de cómo mejoró mi vida desde que aparecisteis, ojala hubierais estado todos desde el principio. Gracias por esas conversaciones impagables en las comidas y por las muchas risas que nos hemos pasado. Voy a echar de menos la paz de Nines en el laboratorio, las conversaciones incansables con Sonia, el contarle mi vida a Mónica (aunque digas que soy muy reservado), lo fácil que es reírse cuando estás con Dani, la dulzura de

Amanda, o a mi ex-vecina de Hortaleza, Mónica, con la que me he divertido muchísimo en muy poco tiempo. De veras, me habéis ayudado un montón, seguro que más de lo que pensáis. ¡Que el “chachilab” no decaiga!

Gracias también a Raquelita por haberme acompañado tantas mañanas a tomar la Coca-Cola de las 12, que como terapia de desahogo no ha estado nada mal. Un beso muy grande.

Fuera del Instituto también hay vida, aunque a veces muy parecida... Gracias a mis amigos del CNB: Carmen, Juan, Lucas, Bea y Ana, porque cada vez que os veo es como si no nos hubiéramos dejado de ver nunca. Sabéis todos muy bien lo que ha significado esto para mí y además sois casi los únicos con los que puedo hablar de probetas. Lucas, al final no me he pasado al lado oscuro que una vez planeamos, no sé si se me quedará la espinita. Gracias a Anita porque incluso desde el “exilio” alemán te he podido contar mis progresos con ISG15 y mis rollos personales varios. Bea, gracias por haber estado siempre tan pendiente de mí, por haberme animado tanto y por ser tan genial como eres.

Nada sería igual sin las cañas de los viernes y sin los amigos con los que me las llevo tomando desde hace más de veinte años: Oscar, Rober, Bully Cancho, Cano, Cesar, David y Alfonso. Sois ya más familia que amigos. Gracias a todos por estar siempre ahí para lo bueno y para lo malo. Por cierto, aunque a veces no me hagáis ni caso cuando hablo de ciencia, yo os quiero exactamente igual.

Por supuesto, esta tesis se la quiero dedicar a mi madre, espero que sepas que me tienes para lo que necesites como siempre te he tenido yo a ti, y que te puedas sentir orgullosa de tener un hijo Doctor “que trabaja en laboratorio”. También va para mi tío Víctor, que sé que le hace ilusión tener un sobrino Doctor.

Silvia, sé que no quieres aparecer aquí, pero que quieres que te diga... ¡Te aguantas! Te he dejado para el final porque podrías formar parte del trabajo, los amigos, la familia... y al final me he dado cuenta de que estás en todos los lados, así que te mereces una sección por separado. Tranquila, seré breve, gracias por compartir tu vida conmigo, por ayudarme en todo y por ser mi mejor amiga y compañera. Tú como nadie sabes lo que significa esto, gracias por estar siempre ahí.

ABREVIATURAS.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNc	ARN complementario.
ARNdc	ARN de doble cadena.
ARNip	ARN de interferencia pequeño.
ARNm	ARN mensajero.
ARNv	ARN viral.
ATP	Adenosin trifosfato.
BSA	Albúmina sérica bovina.
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
DMEM2	Medio DMEM con un 2% de suero fetal bovino.
DMEM10	Medio DMEM con un 10% de suero fetal bovino.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DUBs	Enzimas deubiquitinadas.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático.
IFN	Interferón.
IL6	Interleuquina 6.
IL8	Interleuquina 8.
ISGs	Genes estimulados por interferón.
ISRE	Elementos de respuesta a interferón.
kb	Kilobase.
kD	Kilodalton.
KO	De sus siglas en inglés “knockout”
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón.
ml	Mililitro.
ng	Nanogramo.
nm	Nanometro.
nM	Nanomolar.
nt	Nucleótido.
PAMPs	De sus siglas en inglés “pathogen-associated molecular patterns”.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pCMV6-Neo	Plásmido control.
pCMV6-Neo-ISG15	Plásmido con sobreexpresión de la proteína ISG15.
pCMV6-Neo-ISG15-LRAA	Plásmido con sobreexpresión de la proteína ISG15 con una mutación en el extremo carboxi-terminal.

pMol	Picomol.
PRRs	De sus siglas en inglés “pattern recognition receptors”.
qRT-PCR	Reacción de retrotranscripción reversa acoplada a la PCR cuantitativa
RLR	De sus siglas en inglés “RIG-I like receptors”.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción reversa acoplada a la PCR.
SFB	Suero fetal bovino.
TALEN	De sus siglas en inglés “transcription activator-like effector nucleases”.
TLR	De sus siglas en inglés “toll like receptor”.
U	Unidad
ufp	Unidad formadora de placa.
μl	Microlitro.
μm	Micra.
VRSH	Virus respiratorio sincitial humano.

ÍNDICE.

I. RESUMEN EN INGLÉS.	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Virus respiratorio sincitial humano	2
1.1. Clasificación.	2
1.2. Epidemiología y transmisión.	3
1.3. Sintomatología, patología e impacto social.	4
1.4. Diagnóstico.	5
1.5. Tratamiento.	6
1.6. Biología molecular del VRSH.	7
1.6.1. Morfología.	7
1.6.2. Genoma.	8
1.6.3. Proteínas virales.	9
1.6.4. Ciclo viral.	11
1.7. Respuesta inmune frente al VRSH.	13
1.7.1. Respuesta inmune innata.	13
1.7.1.1. Receptores TLR (Toll Like Receptors).	14
1.7.1.2. Receptores RLR (RIG-I Like Receptors).	15
1.7.1.3. Interferón.	15
1.7.2. Respuesta inmune adaptativa.	18
2. ISG15.	20
2.1. Estructura de la proteína.	20
2.2. ISG15 libre.	21
2.3. ISGilación.	22
2.3.1. Mecanismo enzimático.	22
2.3.2. La ISGilación es un proceso reversible.	23
2.3.3. Proteínas diana de ISG15.	24
2.3.4. La ISGilación afecta mayoritariamente a proteínas de nueva síntesis.	24
2.3.5. Función de la ISGilación.	25
2.4. Papel antiviral de ISG15.	25
2.5. Mecanismos de evasión viral frente a ISG15.	27

III. OBJETIVOS.	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	30
1. Materiales.	30
1.1. Material biológico.	30
1.1.1. Líneas celulares establecidas.	30
1.1.2. Epitelios pseudoestratificados.	30
1.1.3. Lavados nasofaríngeos.	30
1.1.4. Virus.	31
1.1.5. Bacterias.	31
1.1.6. Plásmidos.	31
1.1.7. Medios de cultivo.	32
1.1.7.1. Medios de crecimiento de células eucariotas.	32
1.1.7.2. Medios de crecimiento de bacterias.	32
1.2. Reactivos.	32
1.2.1. Anticuerpos.	32
1.2.2. ARNs de interferencia pequeños.	32
1.2.3. Oligonucleótidos.	33
1.2.4. Sondas qRT-PCR.	33
1.2.5. Tampones.	34
1.2.6. Otros reactivos.	34
2. Métodos.	35
2.1. Manipulación de células y virus.	35
2.1.1. Cultivos celulares.	35
2.1.1.1. Mantenimiento y conservación.	35
2.1.1.2. Recogida de muestras celulares.	35
2.1.2. Virus.	35
2.1.2.1. Infección con el VRSH.	35
2.1.2.2. Purificación del VRSH.	36
2.1.2.3. Titulación del VRSH.	36
2.1.3. Generación <i>in vitro</i> de epitelios pseudoestratificados.	37

2.1.4. Toma de muestras de lavados nasofaríngeos.	38
2.2. Manipulación de bacterias.	38
2.2.1. Generación de bacterias competentes.	38
2.2.2. Transformación de bacterias competentes.	38
2.2.3. Cultivo y conservación de bacterias.	39
2.3. Manipulación de ARN.	39
2.3.1. Extracción de ARN de células eucariotas.	39
2.3.2. Reacción de la transcriptasa reversa.	39
2.4. Manipulación de ADN.	40
2.4.1. Extracción de ADN de células eucariotas.	40
2.4.2. Extracción de plásmidos de bacterias.	40
2.4.3. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	40
2.4.4. RT-PCR cuantitativa.	40
2.4.5. Secuenciación de ADN.	41
2.4.6. Generación de plásmidos.	41
2.4.6.1. Plásmido control.	41
2.4.6.2. Clonaje de ISG15.	42
2.4.6.3. Generación mediante mutagénesis dirigida de un plásmido que expresa ISG15 no conjugante.	43
2.5. Manipulación de proteínas.	43
2.5.1. Extracción de proteínas totales.	43
2.5.2. Cuantificación de proteínas.	43
2.5.3. Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE e inmunodetección (Western blot).	44
2.6. Ensayos de silenciamiento.	44
2.7. Sobreexpresión de ISG15.	45
2.8. Generación de células knockout para ISG15.	45
2.9. Estadística.	46
V. RESULTADOS.	47
	47
1. Expresión de ISG15 e ISGilación en células A549 infectadas con el VRSH.	47

1.1. La infección por el VRSH induce la expresión de ISG15 y de las enzimas implicadas en el proceso de ISGilación.	47
1.2. La infección por el VRSH promueve la ISGilación de proteínas.	49
2. Efecto de la reducción o inhibición de la expresión de ISG15 en la infección por el VRSH.	51
2.1. El silenciamiento de ISG15 en células estimuladas con IFN- β aumenta el título y la acumulación de ARN y proteínas virales.	51
2.2. El título del VRSH aumenta en células “knockout” para ISG15 previamente estimuladas con IFN-B.	53
3. Efecto del aumento de expresión de ISG15 en la infección por el VRSH.	55
4. La actividad antiviral de ISG15 frente al VRSH se debe a procesos de ISGilación.	58
4.1. Una proteína ISG15 mutada incapaz de conjugarse a proteínas diana no tiene efecto antiviral.	58
4.2. El silenciamiento de UbE1L inhibe la formación de conjugados de ISG15 e incrementa el título viral en células infectadas con el VRSH previamente estimuladas con IFN- β .	61
4.3. El silenciamiento de USP18 aumenta la formación de conjugados de ISG15 y disminuye el título viral en células infectadas con el VRSH previamente estimuladas con IFN- β .	63
4.4. El papel de ISG15 como regulador de la respuesta inmune innata no es esencial para su actividad antiviral frente al VRSH.	64
5. Estudio del posible papel de ISG15 en la entrada y la liberación del VRSH de la célula.	66
5.1. ISG15 no afecta a la entrada del VRSH en la célula.	67
5.2. La actividad de ISG15 afecta principalmente a etapas de la replicación del VRSH anteriores a la salida de la célula.	68
6. La expresión de ISG15 correlaciona positivamente con la expresión de la	

nucleoproteína viral en epitelios respiratorios generados <i>in vitro</i> y en lavados nasofaríngeos de niños infectados.	69
6.1. Epitelios pseudoestratificados.	69
6.2. Lavados nasofaríngeos.	70
VI. DISCUSIÓN.	72
1. Inducción de ISG15 por el VRSH y su papel antiviral.	72
2. Relación entre la acción antiviral de ISG15 y el momento de su expresión en la infección por VRSH.	73
3. La ISG15 como mecanismo de acción frente al VRSH.	75
4. Acción de ISG15 en las etapas del ciclo viral.	77
5. Posible papel <i>in vivo</i> de ISG15.	78
VII. CONCLUSIONES.	81
VIII. REFERENCIAS.	82
IX. ANEXO.	92

I. RESUMEN EN INGLÉS.

RESUMEN EN INGLÉS.

Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV), for which neither a vaccine nor an effective therapeutic treatment is currently available, is the leading cause of severe lower respiratory tract infections in children and also a significant cause of morbidity and mortality in the elderly and immunocompromised individuals. Interferon stimulated gene 15 (ISG15) is an ubiquitin-like protein that is highly increased during viral infections and has been reported to play an antiviral activity both through conjugation to target proteins, in a process termed ISGylation, or by free, unconjugated, ISG15. Previous studies from our laboratory demonstrated a strong ISG15 up-regulation during HRSV infection *in vitro*. In this study, an in depth analysis of the role of ISG15 in HRSV infection is presented. ISG15 overexpression and siRNA silencing experiments, along with ISG15 knockout cells (ISG15^{-/-}) revealed an anti-HRSV effect of this molecule. Conjugation inhibition or conjugation stimulation assays demonstrated that, rather than free ISG15, this protein exerts its antiviral activity via protein ISGylation. This antiviral activity requires high levels of ISG15 to be present in the cells before HRSV infection, such as those induced by interferon stimulation. Besides, ISG15 inhibits viral RNA and protein accumulation during HRSV infection and exerts its antiviral activity at a post-entry stage and before virus release from the cell. Finally, ISG15 is also up-regulated in human respiratory pseudo-stratified epithelia and in nasopharyngeal washes from infants infected with HRSV, pointing to a possible antiviral role of this molecule *in vivo*. These results advance our understanding of the innate immune response elicited by HRSV and open new possibilities to control infections by this virus.

II. INTRODUCCIÓN.

INTRODUCCIÓN.

1. VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO.

1.1. Clasificación.

El Virus Respiratorio Sincital Humano (VRSH) fue aislado por primera vez en el año 1956 en un chimpancé aquejado de rinitis y posteriormente en dos niños con enfermedad respiratoria [1].

Este virus se engloba taxonómicamente en la familia *Paramyxoviridae* dentro del orden *Mononegavirales*. La familia *Paramyxoviridae* consta a su vez de dos subfamilias: *Paramyxovirinae* (en la que se incluyen los géneros *Aquaparamixovirus*, *Avulavirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus*, y *Rubulavirus*) y *Pneumovirinae* (en la que se encuentran los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*). El VRSH está considerado como el prototipo del género *Pneumovirus*, dentro del cual, se encuentran otros miembros como el *virus respiratorio sincital bovino* (VRSB) y el *virus de la neumonía murina* (VNM) [2] (Figura 1). La variabilidad de los aislados del VRSH fue demostrada inicialmente a nivel antigénico mediante ensayos de neutralización llevados a cabo con sueros hiperinmunes [3]. Posteriormente, y basándose en el patrón de reactividad con anticuerpos monoclonales frente a distintas proteínas del virus, se describieron dos grupos antigénicos, A y B, que concuerdan con dos líneas evolutivas divergentes [4, 5]. Dentro de estos grupos se pueden definir adicionalmente distintos genotipos basándose en la secuencia de varios genes virales aunque más específicamente en el gen de la proteína G [6-8] .

Los virus incluidos en la familia *Paramyxoviridae* tienen una serie de características comunes: 1) su genoma está formado por una única molécula de ARN de polaridad negativa rodeada de una nucleocápsida helicoidal que le confiere resistencia a las ARNasas; 2) el genoma se transcribe por la acción de la ARN polimerasa viral de forma secuencial desde el extremo 3' dando lugar a ARN mensajeros (ARNm) subgenómicos; 3) el ciclo de replicación viral se produce en su totalidad en el citoplasma; 4) la entrada en la célula se produce mediante la fusión de las membranas viral y celular; y 5) la salida se lleva a

cabo mediante gemación incorporando parte de la membrana celular a la partícula viral [9].

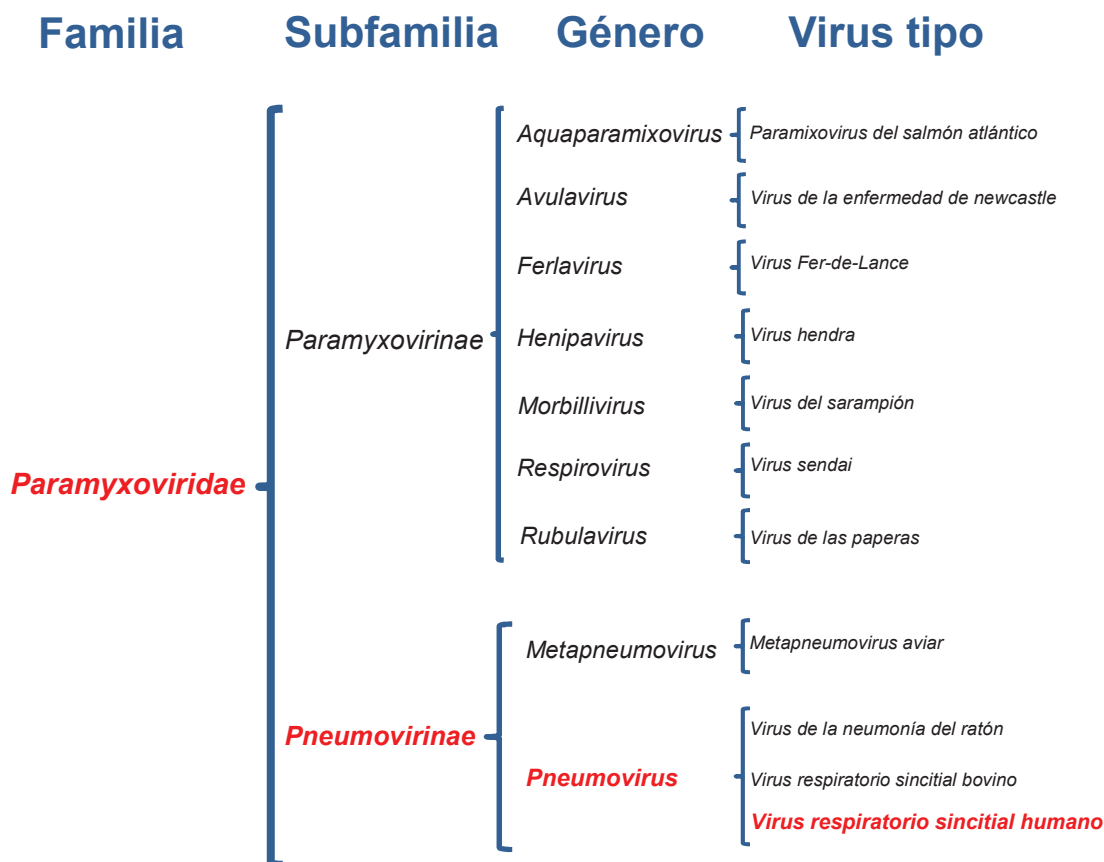


Figura 1. Clasificación de la familia *Paramyxoviridae* con especial referencia a la familia, subfamilia y género del virus respiratorio sincitial humano. Tomada del Comité Internacional para la Taxonomía de Virus.

1.2. Epidemiología y transmisión.

Desde su primera descripción, el VRSH se ha identificado epidemiológicamente como el mayor responsable de hospitalizaciones y mortalidad en edad pediátrica debido a cuadros de bronquiolitis y neumonía [10, 11]. Se estima que el 90% de los niños se han infectado por este virus a la edad de dos años y casi la mitad de ellos han experimentado al menos una segunda infección [12]. A su vez, la población adulta también se puede ver afectada, aunque normalmente de manera menos severa, siendo ancianos e inmunodeprimidos especialmente susceptibles [13, 14].

Normalmente, se producen epidemias anuales en los meses de invierno en las zonas de clima templado o en las estaciones de lluvia en zonas tropicales. En una misma epidemia y comunidad, es frecuente que circulen simultáneamente virus pertenecientes a los dos grupos antigénicos (A y B), aunque uno de los dos sea predominante. Esta predominancia normalmente varía en ciclos cortos de alrededor de dos años, poniendo de manifiesto que la respuesta inmune frente a cepas de un determinado grupo podría limitar la propagación de éstas en años sucesivos haciendo por tanto que se seleccionen variantes del otro grupo [15].

El VRSH es un virus muy contagioso y su transmisión ocurre mediante el contacto directo de las mucosas nasofaríngeas o conjuntivas con secreciones respiratorias procedentes de individuos infectados. El periodo de incubación oscila generalmente entre cuatro y cinco días mientras que la duración de la excreción viral por parte del paciente es de alrededor de tres semanas, pudiéndose prolongar incluso durante meses en pacientes inmunodrepimidos [16, 17].

1.3. Sintomatología, patología e impacto social.

La infección por el VRSH se inicia con la multiplicación del virus en las células epiteliales del tracto respiratorio superior y suele estar restringida a las vías respiratorias altas sin asociarse con una larga patología. La sintomatología es dependiente en gran medida de la edad del paciente. En el caso de recién nacidos, se observan síntomas poco específicos como retraso en el desarrollo, respiración intermitente o apnea y dificultad para comer. Cuando se trata de niños de mayor edad o de adultos, se pueden manifestar diversos síntomas como rinitis, tos y fiebre baja. Sin embargo, y probablemente como consecuencia de la aspiración de secreciones, el virus puede progresar hacia el epitelio bronquiolar, donde replica más eficientemente, produciendo una infección de las vías respiratorias bajas [18]. Cuando esto ocurre, se producen síntomas de mayor gravedad como bronquiolitis y neumonía que incluyen resistencia al respirar, sibilancias e hipoxia. En etapas avanzadas de la enfermedad donde la hipoxia es extrema, puede ocurrir un fallo respiratorio. Las radiografías de pecho muestran generalmente atelectasia, infiltrados irregulares e hiperinflamación [19]. Los principales afectados son niños de corta

edad, siendo las infecciones primarias las responsables de la aparición de una sintomatología más grave. Existen distintos factores de riesgo que pueden agravar la enfermedad como el nacimiento prematuro, enfermedades pulmonares o cardíacas crónicas, o en general cualquier tipo de inmunodeficiencia [12].

Aunque la respuesta del sistema inmune frente a la infección es fundamental para resolver la infección por el VRSH, la existencia de una respuesta inmune exacerbada o inadecuada, con una gran producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, es en muchos casos la responsable del empeoramiento de los síntomas de la infección primaria [20]. Existen además estudios que relacionan la edad de aparición de la infección por el VRSH con el desarrollo posterior de asma, aunque hay cierta controversia al respecto [21, 22].

Se estima que alrededor de 30 millones de niños menores de 5 años sufren infecciones agudas del tracto respiratorio inferior debidas el VRSH al año en todo el mundo, de los cuales, al menos 3 millones necesitan hospitalización, muriendo entre 66.000 y 199.000 [11]. El impacto económico que se deriva de las hospitalizaciones y el tratamiento debido a la infección por el VRSH es además muy elevado. En un estudio realizado en España entre los años 1997 y 2011, se estimó un gasto medio total de 47 millones de euros por año para el Sistema Nacional de Salud [23].

1.4. Diagnóstico.

El diagnóstico preliminar de la infección por el VRSH se realiza atendiendo a los síntomas clínicos y a la época del año así como a otros marcadores epidemiológicos. La prueba más concluyente para diagnosticar el VRSH en el laboratorio es el aislamiento y crecimiento del virus en cultivos celulares a partir de muestras provenientes de hisopos nasales, lavados nasales o aspirados nasofaríngeos. Sin embargo, debido a la inestabilidad del virus y al alto coste de la técnica, esta no es la opción más frecuente. En la actualidad, existen distintas técnicas comerciales para el diagnóstico en las que se detecta la presencia de ARN viral (ARNv) por RT-PCR o la presencia de antígenos virales por inmunofluorescencia, ELISA, o inmunocromatografía [24-26].

1.5. Tratamiento.

A pesar de los numerosos años de investigación, hasta la fecha no se ha conseguido un tratamiento eficaz contra la infección por el VRSH. Aunque el objetivo más perseguido es el desarrollo de una vacuna, especialmente para los niños menores de un año, todos los esfuerzos al respecto han resultado infructuosos hasta el momento [19]. El desarrollo de una vacuna presenta grandes dificultades que se deben tanto a características del virus como del hospedador. En primer lugar, el hecho de que los principales afectados sean niños de muy corta edad, implica que estos cuentan todavía con un sistema inmunológico poco desarrollado e inmaduro que no responde de forma adecuada a la inmunización. Otro motivo es que incluso la propia infección natural no produce inmunidad a largo plazo como indica el hecho de que las reinfecciones sean tan frecuentes. Otros factores implicados son la capacidad del VRSH de evadir eficazmente el sistema inmune innato, la existencia de dos grupos antigénicos circulantes del virus y la falta de algún sistema animal apropiado para llevar a cabo investigaciones concluyentes [27].

Los primeros intentos para desarrollar una vacuna se llevaron a cabo en los años 60 mediante la inactivación del virus con formol y su posterior administración intramuscular [28]. Inesperadamente, y a pesar de que la vacuna resultaba inmunogénica, los niños incluidos en el ensayo no sólo no mostraron protección frente una infección natural posterior por el virus, sino que sufrieron una enfermedad más grave que los controles y dos de ellos murieron [28]. Este resultado ha llevado a extremar las precauciones en cuanto al desarrollo de vacunas frente a este virus y ha dificultado la realización de ensayos clínicos. En los últimos años se han utilizado distintas estrategias en el desarrollo de una vacuna. Las principales líneas de investigación se basan en el uso de cepas vivas atenuadas del VRSH, vacunas basadas en subunidades del virus (fundamentalmente las proteínas F y G), o vacunas basadas en distintos vectores como vaccinia o adenovirus que expresan estas proteínas [29-33].

En cuanto al uso de antivirales, se han ensayado compuestos como la ribavirina, que si bien interfiere en la transcripción y la replicación viral, no ha dado lugar a resultados clínicos favorables [34]. Hasta la fecha, el único tratamiento que ha mostrado efectividad es la inmunización pasiva con un

anticuerpo monoclonal humanizado frente a la proteína F del virus denominado Palivizumab (Synagis). Este anticuerpo reduce un 55% las hospitalizaciones en niños con alto riesgo de desarrollar la infección por el VRSH aunque, desafortunadamente, su alto coste hace que su uso sea bastante restringido [35].

Actualmente, las medidas profilácticas como la higiene de las manos y el aislamiento de los enfermos, siguen siendo las más eficaces para prevenir la dispersión del virus.

1.6. Biología molecular del VRSH.

1.6.1. Morfología.

El virión del VRSH consiste en una nucleocápsida recubierta por una bicapa lipídica que deriva de la membrana celular. La mayor parte de los viriones aparecen asociados a la membrana celular y son muy termosensibles. Los viriones son heterogéneos en cuanto a la forma y el tamaño, encontrándose formas redondeadas (100-350 nm de diámetro) o filamentosas (60-200 nm de diámetro y hasta 10 μm de largo) [12].

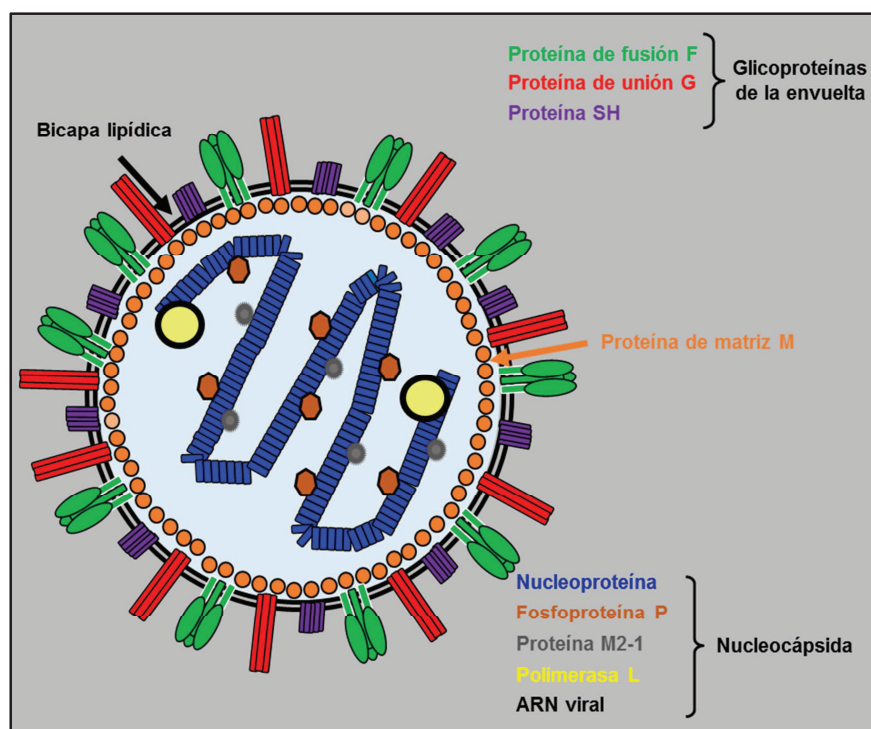


Figura 2. Representación esquemática de la partícula del VRSH. Adaptada a partir del Fields Virology (2013).

En la envuelta se insertan tres glicoproteínas transmembrana codificadas por el virus: la proteína G de unión al receptor, la proteína de fusión F y la proteína pequeña hidrofóbica SH. Por la cara interna de la envuelta viral se encuentra la proteína de matriz M. El ARNV se encuentra asociado a cuatro proteínas formando la nucleocápsida: la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, el factor de transcripción M2-1 y la polimerasa viral L [12] (Figura 2).

1.6.2. Genoma.

El VRSH consta de una única cadena de ARN de polaridad negativa de alrededor de 15 kb [36]. Este ARN no posee estructura CAP ni se encuentra poliadenilado, pero en cambio, está estrechamente rodeado por una nucleoproteína viral que le confiere resistencia a las ARNasas y le protege frente al reconocimiento por parte de receptores específicos celulares implicados en la respuesta inmune innata como RIG-I o PKR [12]. En los extremos del ARNV existen dos regiones no codificantes: una región “leader” en el extremo 3’ de 44 nucleótidos, y una región “trailer” en el extremo 5’ de 155 nucleótidos [37]. La molécula de ARN del VRSH contiene 10 genes, que codifican para un total de 11 proteínas, que se ordenan linealmente a lo largo del genoma separados por secuencias intergénicas que varían entre 1 y 58 nucleótidos, con la excepción de los dos últimos genes (M2 y L) en los que existe un solapamiento de 68 nucleótidos [38] (Figura 3).

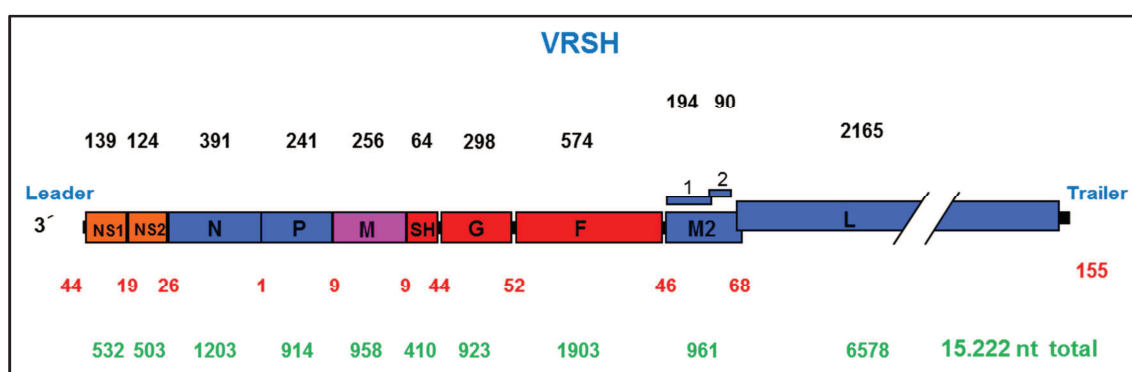


Figura 3. Representación esquemática del genoma del VRSH. Adaptada a partir de Fields Virology (2013). En negro se representan el número de aminoácidos de cada proteína, en rojo se representan el número de nucleótidos de la región leader, la región tráiler y los espacios intergénicos, y en verde se representan el número de nucleótidos de cada gen.

Cada uno de los genes comienza con una secuencia altamente conservada de 9 nucleótidos denominada “gene-start” (GS) cuya función es controlar el inicio de la transcripción y la adición de la estructura CAP en el extremo 5'. A su vez, todos los genes finalizan con una secuencia semiconservada de 12-13 nucleótidos denominada “gene-end” (GE) que se encarga de dirigir la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm [39].

1.6.3. Proteínas virales.

Las principales características de las proteínas codificadas por el VRSH son las siguientes:

- NS1 y NS2. Proteínas no estructurales que únicamente se encuentran en el género *Pneumovirus*. Ambas interfieren en la inducción y la señalización de interferones tipo I y tipo III, suprimiendo así una de las principales vías de respuesta innata de la célula [40, 41]. La delección de los genes codificantes para estas proteínas da como resultado virus viables pero atenuados *in vivo* e *in vitro* [12].
- Nucleoproteína (N). Esta proteína estructural es el componente mayoritario de la partícula viral. Se encuentra fuertemente unida a lo largo del ARN genómico así como del ARN antigenómico formando nucleocápsidas helicoidales resistentes a las ARNasas [12].
- Fosfoproteína (P). La proteína P es el principal cofactor de la polimerasa viral (L) y es esencial para la formación y activación del complejo de la polimerasa, permitiendo a éste tener acceso al ARNv que se encuentra unido a la nucleocápsida. Su forma soluble facilita la unión de la nucleoproteína a los ARN virales de nueva formación (genoma y antigenoma) y previene que ésta se autoagregue o se una a ARNs de origen no viral. Además, se une a las proteínas L y M2-1 facilitando la unión de éstas a la nucleocápsida [12, 42].
- Proteína de matriz (M). Forma parte de la cara interna de la envuelta viral. Tiene un papel crucial en las fases de ensamblado y salida del virus. Su asociación con el complejo de ribonucleoproteína inhibe la transcripción viral y facilita la formación del virión actuando de puente entre este complejo y la envuelta [43].

- Proteína pequeña hidrofóbica (SH). Se trata de una proteína transmembrana localizada en la superficie de la envuelta. Aunque su papel no se conoce con claridad, se ha descrito su función como viroporina, por lo que modificaría la permeabilidad de la membrana. Esta proteína tendría implicaciones en el proceso de salida del virus y procesos de apoptosis. [44].
- Glicoproteína de unión al receptor (G). Esta proteína se produce en la célula infectada de dos formas diferentes: 1) como proteína transmembrana tipo II que se incorpora a los viriones y 2) como forma soluble secretada por las células. En la partícula viral se encuentra en la envuelta y se trata de la principal proteína de unión a la célula. Esta unión se realiza a través de glicosaminoglicanos que se encuentran formando parte del glucocalix de la membrana celular [45, 46]. La forma soluble, que constituye aproximadamente el 20%, parece tener algún papel inmunomodulador [47, 48]. Su delección da como resultado virus viables aunque atenuados *in vivo* e *in vitro* [12].
- Glicoproteína de fusión (F). Proteína transmembrana de la superficie de la envuelta. Juega un papel crucial en la entrada del virus a la célula, mediando en la fusión de las membranas viral y celular [49]. En etapas posteriores del ciclo infectivo, la proteína F está implicada en la diseminación del virus mediante la fusión de las membranas de las células infectadas formando sincitios [50].
- Proteína M2-1 o 22k. Esta proteína forma parte de la nucleocápsida viral. Actúa como un factor transcripcional esencial para la viabilidad viral ya que funciona como un anti-terminador promoviendo la procesividad en la transcripción. En su ausencia, la polimerasa viral termina la transcripción prematuramente [51].
- Proteína M2-2. Esta proteína se expresa en muy bajas cantidades y no se conoce si forma parte del virión. Modula el cambio de transcripción a replicación en la síntesis de ARN [52]. Su delección da como resultado virus viables aunque atenuados *in vivo* [29].
- ARN polimerasa ARN dependiente (L). Se encuentra asociada a la nucleocápsida y dirige la síntesis de los ARNm virales, la síntesis del intermediario replicativo de polaridad positiva y la síntesis del ARNv de la

progenie. Además de la actividad polimerasa, se han descrito otras actividades enzimáticas como metilación, poliadenilación y “capping” [12, 53].

1.6.4. Ciclo viral.

La unión del VRSH a las células a las que infecta está mediada por la unión de las proteínas G y F a moléculas que forman parte de la membrana celular. Aunque no se conocen con exactitud todos los posibles receptores implicados en este proceso, existen datos que identifican a glicosaminoglicanos (GAGs) como el heparán sulfato y el condroitin sulfato como dianas de unión de la proteína G [46, 54] y a la nucleolina como diana de la proteína F [55]. Los virus recombinantes que no expresan la proteína G son también capaces de infectar células *in vitro*, pero son atenuados *in vivo*. Por lo tanto, aunque la proteína G no es necesaria para la infección de ciertos tipos celulares, se requiere para una eficiente infectividad *in vivo* [56]. La entrada a las células se realiza gracias a la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática mediada por la proteína F o la fusión con membranas de endosomas después de una endocitosis mediada por clatrina [12]. Una vez liberada la nucleocápsida en el interior de la célula, la transcripción y replicación se llevan a cabo en el citoplasma. Los 10 genes de la molécula de ARN se transcriben secuencialmente en 10 ARNm subgenómicos con un marco de lectura abierta cada uno. El ARNm del gen M2 da lugar a dos proteínas (M2-1 y M2-2) mediante dos marcos de lectura diferentes. La transcripción de la molécula de ARNv sigue el modelo general descrito para el orden *Mononegavirales*. La polimerasa viral inicia la transcripción partiendo de un único promotor situado en el extremo 3' y sintetiza los ARNm mediante un mecanismo de parada y reinicio en cada secuencia intergénica [57]. El hecho de que sólo una fracción de la polimerasa sea capaz de moverse hasta el siguiente gen, propicia la creación de un gradiente transcripcional en el que los genes situados más cerca del promotor son transcritos con mayor frecuencia [58] (Figura 4).

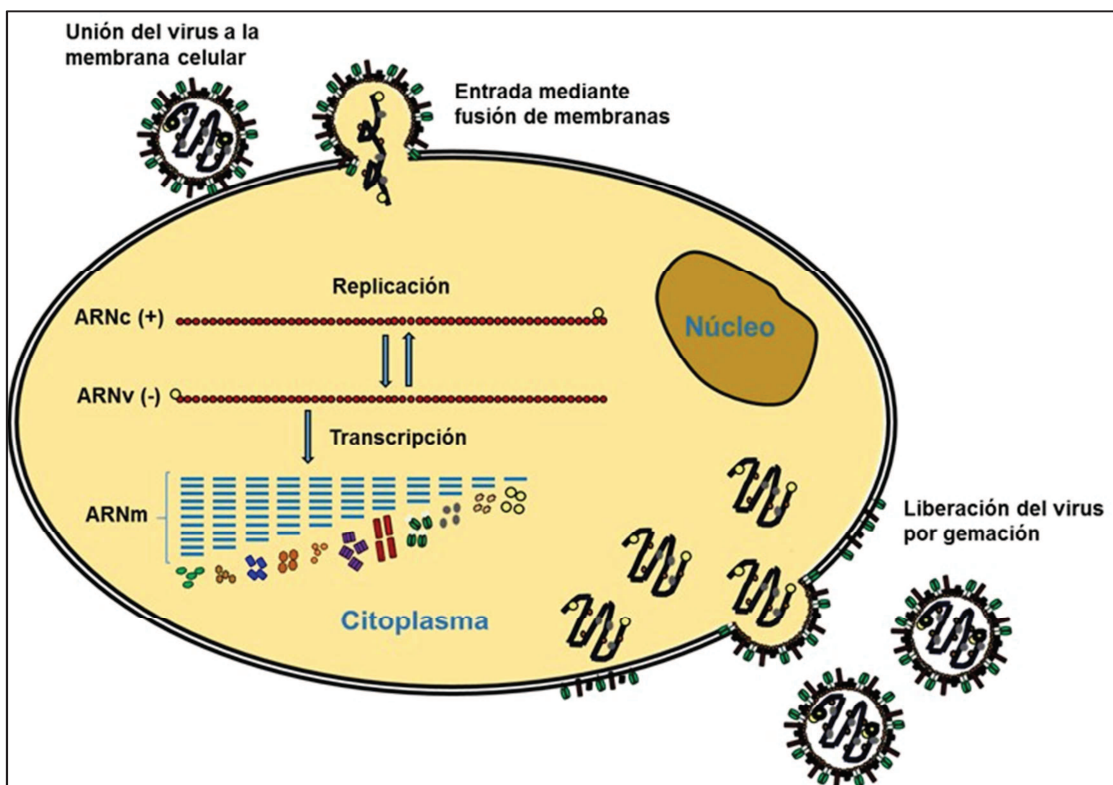


Figura 4. Esquema del ciclo de replicación del VRSH.

La replicación del genoma viral implica la formación de una copia complementaria y exacta de polaridad positiva denominada antigenoma, que a su vez, sirve como molde para la polimerasa para generar las copias del ARNv. El cambio que se produce entre la transcripción y la replicación del ARN está mediado por la proteína M2-2. En las etapas iniciales de la infección, los bajos niveles de M2-2 se corresponden con una alta tasa de transcripción. Por el contrario, cuando los niveles intracelulares de M2-2 aumentan, la transcripción es inhibida a favor de la replicación [52]. Tanto el genoma como el antigenoma se encuentran en forma de nucleocápsidas tanto en las células infectadas como en el virión.

Una vez formadas las nucleocápsidas en el citoplasma, estas se transportan hasta zonas determinadas de la cara interna de la membrana celular donde se encuentran situadas las proteínas de la envuelta (F, G y SH) y la proteína M, responsable de la asociación de las nuevas nucleocápsidas con las envolturas virales. La liberación de las partículas virales se realiza por gemación, mediante la cual, se adquiere la envoltura a partir de la membrana plasmática (Figura 4).

1.7. Respuesta inmune frente al VRSH.

El sistema inmune juega un papel esencial en el control de la infección por el VRSH y normalmente las infecciones son resueltas por la acción del sistema inmune innato y adaptativo. Las células diana de este virus son las células epiteliales del tracto respiratorio, aunque también se pueden infectar macrófagos y células dendríticas menos permisivamente. Como consecuencia de la infección, se producen de manera localizada una gran cantidad de citoquinas y quimioquinas que desencadenan una respuesta inflamatoria de la que dependerá en gran medida el grado de patología de la infección.

1.7.1. Respuesta inmune innata.

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa del organismo frente a la infección y juega un papel crucial en el reconocimiento temprano de los microorganismos y la consiguiente activación de la respuesta contra estos. Esta respuesta responde al reconocimiento de estructuras específicas de los patógenos que están altamente conservadas evolutivamente, y que por tanto son esenciales para su supervivencia, denominadas PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Estos patrones moleculares se caracterizan por la similitud entre ellos aun siendo pertenecientes a diferentes patógenos (virus, bacterias, hongos o protozoos) y por ser fácilmente distinguibles de las estructuras propias celulares. El reconocimiento de estas estructuras por parte de la célula se realiza a través de receptores celulares denominados PRRs, (Pattern Recognition Receptors). Una vez que se reconoce la presencia de un patógeno, se desencadena una respuesta antimicrobiana y proinflamatoria mediante la activación de una multitud de cascadas de señalización intracelulares en las que participan moléculas adaptadoras, quinasas y factores de transcripción entre otros, que como fin último son responsables de la activación y expresión de numerosos genes y la síntesis de un gran número de moléculas como citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión celular e inmunorreceptores. En su conjunto, todas estas moléculas orquestan la respuesta temprana a la infección y son una conexión con la respuesta inmune adaptativa [59].

En el caso del VRSH, se ha demostrado la sobreexpresión de numerosos genes implicados en la respuesta inmune innata como consecuencia de la infección *in vitro* en células A549, lo que indica una compleja respuesta celular a la infección [60].

1.7.1.1. Receptores TLR (Toll Like Receptors).

Los receptores TLR constituyen una familia de proteínas receptoras transmembrana tipo I de las cuales se han descrito hasta la fecha diez tipos diferentes en humanos (TLR1-TLR10). Las moléculas que reconocen son carbohidratos de bacterias, ácidos nucleicos de virus y bacterias, peptidoglicanos o lipoproteínas entre otros. Los TLRs se pueden dividir principalmente en dos grupos dependiendo de su localización celular y el tipo de PAMPs que reconocen. El primer grupo comprende aquellos que se expresan en la superficie celular y reconocen principalmente lípidos, proteínas y lipoproteínas (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10). En segundo lugar se encuentran aquellos que se expresan exclusivamente en vesículas intracelulares como el retículo endoplasmático, endosomas, lisosomas o endolisosomas y reconocen ácidos nucleicos (TLRs 3, 7, 8 y 9). Tras su activación, se inician dos rutas principales de señalización dependiendo del adaptador que se utilice: 1) la ruta dependiente de MyD88 que da como resultado la inducción de citoquinas proinflamatorias gracias a la activación de NF- κ B, y 2) la ruta dependiente de TRIF que da como resultado la inducción de interferón tipo I y citoquinas proinflamatorias gracias a la activación de los factores de transcripción NF- κ B e IRF3 (Figura 5) [61].

El VRSH activa las rutas de señalización mediadas por esos receptores. La proteína de fusión (F) del VRSH actúa como ligando de TLR4 induciendo la producción de IL6, IL8 e interferón tipo I [62]. Aunque existen estudios que asocian mutaciones puntuales en el gen que codifica TLR4 con una mayor severidad de la infección por el VRSH en niños [63], otros estudios no han encontrado tal asociación [64, 65].

Los intermediarios de ARN de doble cadena que se forman durante los procesos de replicación viral son reconocidos por el receptor TLR3. El VRSH induce a tiempos tardíos post-infección la expresión de citoquinas y quimioquinas como IL8 y CCL5 a través de vías activadas por este receptor

[66]. La fuerte inducción de TLR3 tanto a nivel de ARN como de proteína tras la infección por el VRSH no ha demostrado tener un papel relevante en la inhibición de la replicación viral [67, 68].

Otros receptores como TLR2, TLR6 y TLR7 parecen estar también implicados en el reconocimiento del VRSH aunque en menor medida [12, 69].

1.7.1.2. Receptores RLR (RIG-I Like Receptors).

Otra familia de receptores implicados en la respuesta inmune innata es la familia RLR de la cual existen tres miembros: RIG-I, MDA5 y LGP2. La señalización que se desencadena como consecuencia del reconocimiento por parte estos receptores de sus ligandos específicos, tiene como consecuencia la activación de NF- κ B, IRF3, IRF7 y la producción de interferón tipo I. Esta función se realiza en coordinación con receptores tipo TLR y otros factores [70]. El principal ligando que reconocen estos receptores es el ARN de doble cadena, por lo que juegan un papel importante en las infecciones por virus ARN. RIG-I, el principal componente de esta familia, reconoce además con cierta preferencia secuencias cortas de ARN marcadas con tres fosfatos en el extremo 5' (5'ppp) [71].

El reconocimiento celular de la infección por el VRSH está mediado principalmente por este receptor, por lo que algunas de las estrategias de evasión de la respuesta inmune que ha desarrollado este virus inciden en su inactivación [72]. RIG-I es responsable de la activación a tiempos tempranos post-infección de los factores de transcripción NF- κ B e IRF3 en el contexto de la infección por el VRSH (Figura 5) [66].

1.7.1.3. Interferón.

La consecuencia final de la activación de las numerosas cascadas de señalización que tienen lugar gracias al reconocimiento de un patógeno por parte de la célula, es la producción de quimioquinas y citoquinas entre las que se encuentra el interferón, responsable a su vez de la activación de numerosos genes con función antiviral y proinflamatoria. La liberación de estos mediadores hacia el medio extracelular alerta al resto de células de la presencia de una infección y hace que se establezca un estado antiviral localizado.

Existen tres familias diferentes de interferones. En humanos, el interferón tipo I está compuesto por 13 subtipos de IFN- α y un único subtipo de IFN- β , todos ellos inducibles en la mayoría de tipos celulares. Además, también forman parte de esta familia los IFN- ω , IFN- ε , IFN- κ , IFN- τ , IFN- δ e IFN- ζ . La familia de interferón tipo II está compuesta únicamente por IFN- γ y se expresa predominantemente en células T y células NK. Por último, la familia de interferón tipo III está compuesta por IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 e IFN- λ 4, todos ellos con funciones similares a los de la familia tipo I pero con una acción más restringida sobre células epiteliales [73, 74].

Todos los tipos de interferón ejercen su acción mediante la unión a receptores de la superficie celular que se encuentran ampliamente distribuidos en la mayoría de los tipos celulares. Los componentes clásicos de la ruta del interferón tipo I son los siguientes: el monómero de IFN tipo I se une de manera autocrina y paracrina a un receptor heterodimérico transmembrana compuesto por las subunidades IFNAR1 e IFNAR2 activando las proteínas asociadas TYK2 y JAK1. Estas dos proteínas, a su vez, fosforilan dos factores de transcripción denominados STAT1 y STAT2 formando un dímero que se transloca al núcleo junto con IRF9 formando un complejo denominado ISGF3. ISGF3 se une a elementos de respuesta a interferón (ISRE) situados en los promotores de numerosos genes denominados ISGs (genes estimulados por interferón) induciendo su expresión (Figura 5) [73, 74].

Se considera que el VRSH es tanto un pobre inductor como un mal respondedor a interferón. Ensayos *in vivo* llevados a cabo en animales de laboratorio han demostrado que el VRSH induce bajas cantidades de interferón en comparación con otros virus respiratorios como influenza A [75], mientras que estudios hospitalarios realizados tanto en pacientes pediátricos como en adultos han mostrado que existen niveles de interferón prácticamente indetectables en las secreciones nasales de estos pacientes en comparación con los detectados en sujetos infectados con influenza A o parainfluenza [76, 77].

Además, la administración de interferón tanto de manera preventiva como terapéutica en sujetos infectados por el VRSH tampoco ha demostrado tener eficacia en la resolución de la infección [78, 79]. De hecho, esto es debido

a que gran parte de las estrategias del virus para evadir la respuesta inmune innata del hospedador van encaminadas a la supresión de la vía del interferón y su producción. Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 del VRSH, funcionando de manera coordinada o bien independientemente, juegan un papel crucial en la inhibición de la ruta del interferón [41]. Ambas proteínas intervienen en la regulación negativa de STAT2 promoviendo su degradación en el proteosoma e interrumpiendo la señalización de las rutas de interferón tipo I y tipo III [40, 80-82]. Además, ambas están implicadas en la regulación negativa de numerosas rutas que inducen interferón. Así, ambas proteínas reducen los niveles del factor TRAF3, implicado en la señalización de varias rutas de inducción de interferón [83], mientras que NS2 inhibe la transcripción de interferón mediante las rutas de señalización de TLR3 y RIG-I impidiendo la interacción de éstos con el resto de moléculas de la vía [72].

Los genes inducidos por interferón (ISGs) pueden además expresarse independientemente de este gracias a vías y rutas redundantes que intentan evitar los mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata desarrollada por los virus y mantener un correcto estado antiviral. Por ejemplo, IRF7 es un factor regulador de interferón que se activa por fosforilación como respuesta a una infección celular. Una vez activado, se transloca al núcleo y transcribe los genes de IFN α y IFN β . En ausencia de interferón, IRF7 es capaz de unirse a ISREs con la misma eficacia con la que lo hace ISGF3 e inducir así determinados ISGs [84]. Además, otras señales como proteínas virales, lipopolisacáridos, ADN y ARN de doble cadena (ARNdc) pueden a su vez inducir la expresión de ISGs en ausencia de interferón activando las rutas de TLR3 y RIG-I entre otras [85].

En el caso de la infección por VRSH, las células expresan gran cantidades de ISGs entre las que se incluye ISG15 [60].

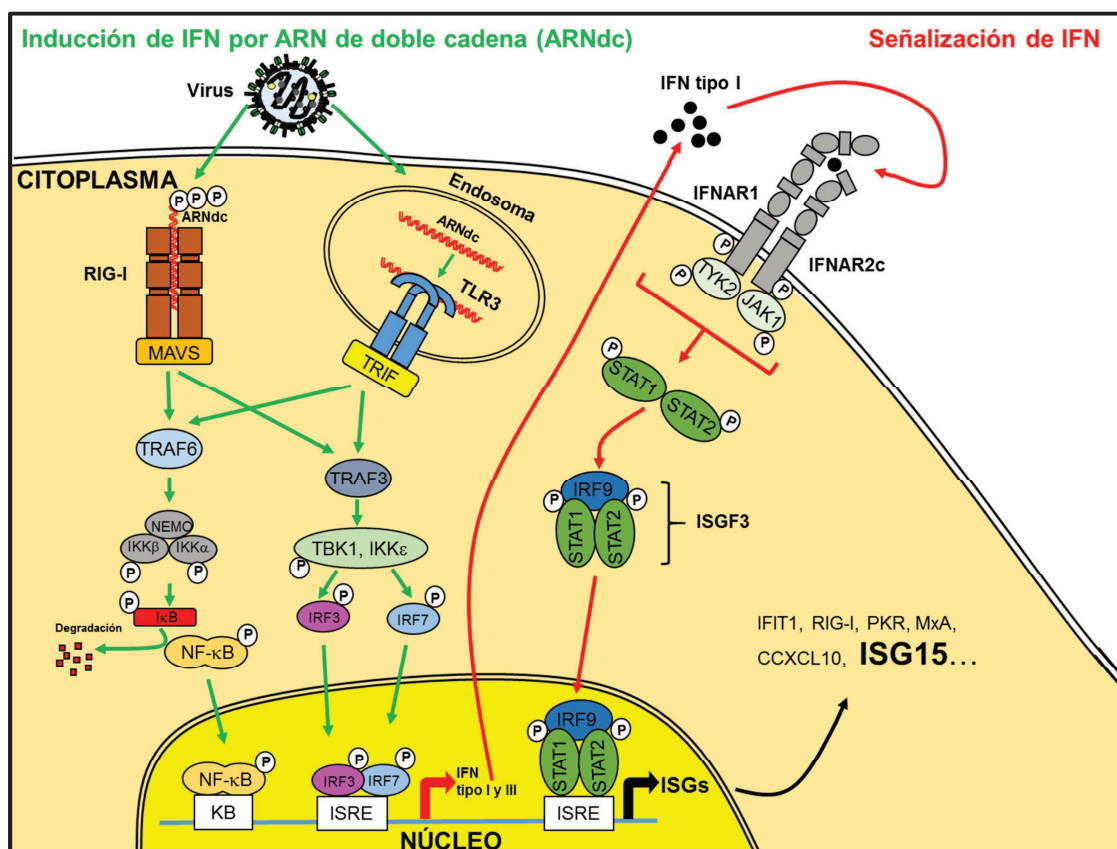


Figura 5. Esquema de la inducción de IFN tipo I y su señalización

1.7.2. Respuesta inmune adaptativa.

En el caso del VRSH, la respuesta inmune adaptativa es la principal responsable de la recuperación frente a la infección así como de generar una respuesta frente a posibles reinfecciones. La protección inmunológica frente al VRSH inducida por la infección natural es muy débil y de corta duración y nunca llega a generarse una inmunidad total, por lo que las reinfecciones son frecuentes durante toda la vida. Sin embargo, el pronóstico y la sintomatología en las sucesivas infecciones siempre son más favorables que los que se producen en la infección primaria [12].

Aunque algunas proteínas virales como la N, P o M2-1 son capaces de inducir la producción de anticuerpos, únicamente las proteínas F y G son capaces de generar anticuerpos neutralizantes, demostrando ser así los principales determinantes antigénicos para generar resistencia frente a la infección por el VRSH [86, 87]. Se pueden encontrar anticuerpos neutralizantes frente al VRSH en el suero de niños recién nacidos. Estos anticuerpos son transferidos a través de la placenta de la madre durante la gestación y son los

responsables de la protección de estos niños durante los primeros meses de vida. Existe una relación inversa entre el título de anticuerpos neutralizantes en el suero y la frecuencia de infecciones graves causadas por el VRSH [88]. Por tanto, el nacimiento prematuro, y por consiguiente la existencia de una menor cantidad de anticuerpos en sangre, es un importante factor de riesgo frente a la infección [12]. Como se ha comentado con anterioridad, la inmunización pasiva con un anticuerpo monoclonal frente a la proteína F del VRSH denominado Palivizumab (Synagis) reduce la frecuencia de hospitalizaciones debidas a infecciones por este virus, poniendo de manifiesto la gran importancia del papel de los anticuerpos en la resolución de ésta [35].

Además de los anticuerpos circulantes en el suero, también se ha puesto de manifiesto la importancia de la respuesta inmunitaria localizada en las mucosas respiratorias. La administración pasiva de anticuerpos neutralizantes intranasalmente en animales de experimentación, demostró reducir más potentemente la replicación viral en los pulmones tras un desafío con el VRSH que su administración por vía parenteral [89].

En cuanto a la respuesta celular, los linfocitos T parecen jugar un papel importante en la eliminación del virus. Esto se pone de manifiesto en individuos inmunocomprometidos, en donde la eliminación total del virus puede prolongarse incluso durante meses. En estudios con animales de experimentación en los que se eliminaron los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ mediante anticuerpos específicos, se observó un aumento en el tiempo de eliminación del virus, así como un menor daño pulmonar a nivel histológico, poniendo de manifiesto la implicación de ambos subtipos celulares en la eliminación del virus y en la patología. Al ser reconstituidos los linfocitos T en estos animales, se volvió a generar una respuesta inmunológica eficaz restableciéndose el tiempo normal de eliminación de la infección [90]. En estudios realizados en niños inmunodeprimidos, se ha observado también, que estos tardaban más en eliminar el virus que los niños inmunocompetentes [91].

La respuesta inmune celular parece contribuir al grado de patología durante una infección natural por el VRSH aunque existe controversia en la importancia que juega en comparación con el papel del virus. El VRSH se considera un virus poco citopático, como se ha demostrado infectando epitelios pseudoestratificados diferenciados procedentes de tejidos humanos [92]. La

activación del sistema inmune innato como consecuencia de la infección por el VRSH se asocia con una alta producción de citoquinas y quimioquinas que atraen al sitio de la infección a una gran cantidad de células del sistema inmune, principalmente neutrófilos [93]. Estas células tratan de controlar la infección, sin embargo, en ocasiones una respuesta exacerbada o una producción inapropiada de mediadores inmunes en el tracto respiratorio puede aumentar la inflamación hasta niveles capaces de dañar los epitelios respiratorios durante la eliminación del virus [86]. Se ha observado en ratones de experimentación que la respuesta de los linfocitos T puede contribuir significativamente a la patología asociada a la infección por el VRSH. Así, cuando se transfirieron linfocitos T $CD4^+$ del subtipo 2 (Th2) procedentes de ratones infectados con el VRSH o sometidos a un desafío con la proteína G, a otros ratones infectados con el VRSH, se observó una reducción del título viral en los pulmones pero un incremento en la patología pulmonar caracterizada por infiltraciones de neutrófilos y eosinófilos y hemorragias que resultaron fatales en varios casos [94].

2. ISG15.

ISG15 fue descrita en el año 1979 y se identificó como la primera proteína tipo ubiquitina [95]. Desde esta primera identificación, se han ido sucediendo los descubrimientos sobre su estructura, función y el papel que juega en numerosos procesos celulares entre los que se encuentran la regulación de la respuesta inmune innata, la regulación de la ruta del interferón, e incluso, su alta inducción en varios tipos de cáncer indica un posible papel como regulador negativo de la tumorigénesis [96, 97]. En este trabajo se describe la función de ISG15 en relación con la infección por el VRSH, por lo que a continuación, se detallarán las características principales de esta proteína.

2.1. Estructura de la proteína.

ISG15 es una proteína de 17 kD codificada por el gen *ISG15* que consta de dos dominios tipo ubiquitina conectados en tándem por una corta secuencia de aminoácidos que actúa como bisagra [98]. Cada uno de estos dominios

tiene una homología aproximada del 30% en la secuencia de aminoácidos con la ubiquitina [96]. ISG15 guarda muchas similitudes con esta proteína y el resto de proteínas de la familia en cuanto a estructura y funcionamiento.

2.2. ISG15 libre.

ISG15 se puede encontrar de forma libre tanto intracelular como extracelularmente [99]. No se ha descrito ninguna secuencia de péptidos en ISG15 responsable de su secreción al exterior celular, ni tampoco su liberación se ve afectada por inhibidores de la ruta clásica de secreción del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi [100], por lo que su mecanismo de liberación es desconocido hasta la fecha. La presencia de ISG15 en el medio extracelular haría pensar en la presencia de un receptor celular que regulara una respuesta inmune mediada por esta proteína. Aunque este receptor es desconocido hasta el momento, sí que existen varios estudios que indican una actividad tipo citoquina de ISG15. Por ejemplo, la presencia de ISG15 en el medio extracelular de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), es capaz de inducir de manera indirecta la proliferación de monocitos y células NK mediante la inducción de IFN γ en linfocitos T [101, 102].

Además de este papel de ISG15 en su forma no conjugada como regulador de varios tipos celulares, también puede actuar de forma libre en el interior celular uniéndose de manera no covalente a diferentes proteínas. Por ejemplo, interfiriendo en la degradación proteolítica de USP18 mediada por procesos de ubiquitinación. ISG15 se une de manera no covalente a USP18 e impide su ubiquitinación por la enzima E3-ligasa, SKP2. Esto implica una mayor estabilidad de USP18 y una mayor capacidad de inhibir la ruta del interferón [103].

2.3. ISGilación.

2.3.1. Mecanismo enzimático.

Al igual que la ubiquitina, ISG15 es capaz de conjugarse a proteínas diana [104]. Para ello, se debe generar la forma madura de ISG15 (15 kD) a partir del procesamiento proteolítico de ocho aminoácidos en el extremo carboxi-terminal del precursor de 17 kD. De esta manera, queda expuesta la secuencia aminoacídica LRLRGG cuyas dos últimas glicinas son esenciales para la conjugación [104-106]. Después de este procesamiento, ISG15 puede unirse covalentemente a residuos de lisina de sus proteínas diana a través de un proceso enzimático denominado ISGilación. Este proceso se realiza, al igual que el de ubiquitinación, a través de la acción secuencial de tres enzimas: E1 activadora, E2 conjugadora y E3 ligasa (Figura 6). Al igual que ISG15, la expresión de estas enzimas se induce fuertemente por interferón [107, 108]. La enzima UbE1L (tipo E1) activa ISG15 uniéndose a su extremo C-terminal mediante un puente tioéster dependiente de ATP. Esta enzima es específica de ISG15 por lo que su inhibición impide que se realice la ISGilación, como se ha demostrado mediante la generación de ratones KO para este gen [109, 110]. Después de la activación, ISG15 se transfiere a una cisteína en el sitio activo de la enzima conjugadora Ubch8 (tipo E2). Esta enzima es mayoritaria en la reacción de ISGilación aunque no es específica, pudiendo solapar su actividad con reacciones de ubiquitinación [111, 112]. Como último paso, se transfiere ISG15 a un residuo de lisina de la proteína diana mediante la acción de una enzima tipo E3 ligasa. En el caso de la reacción de ISGilación, se han descrito hasta el momento tres enzimas que pueden actuar en este paso: Efp, HHARI y HERC5 [113-115]. De éstas, Efp y HHARI se ha demostrado que funcionan como ligasas para sustratos específicos y además solapan su actividad con reacciones de ubiquitinación [113, 114]. Por el contrario, HERC5 funciona para numerosos sustratos y es la E3 ligasa mayoritaria para ISG15 como demuestra el hecho de que su silenciamiento provoque la inhibición de la casi totalidad de la ISGilación en células humanas [115, 116].

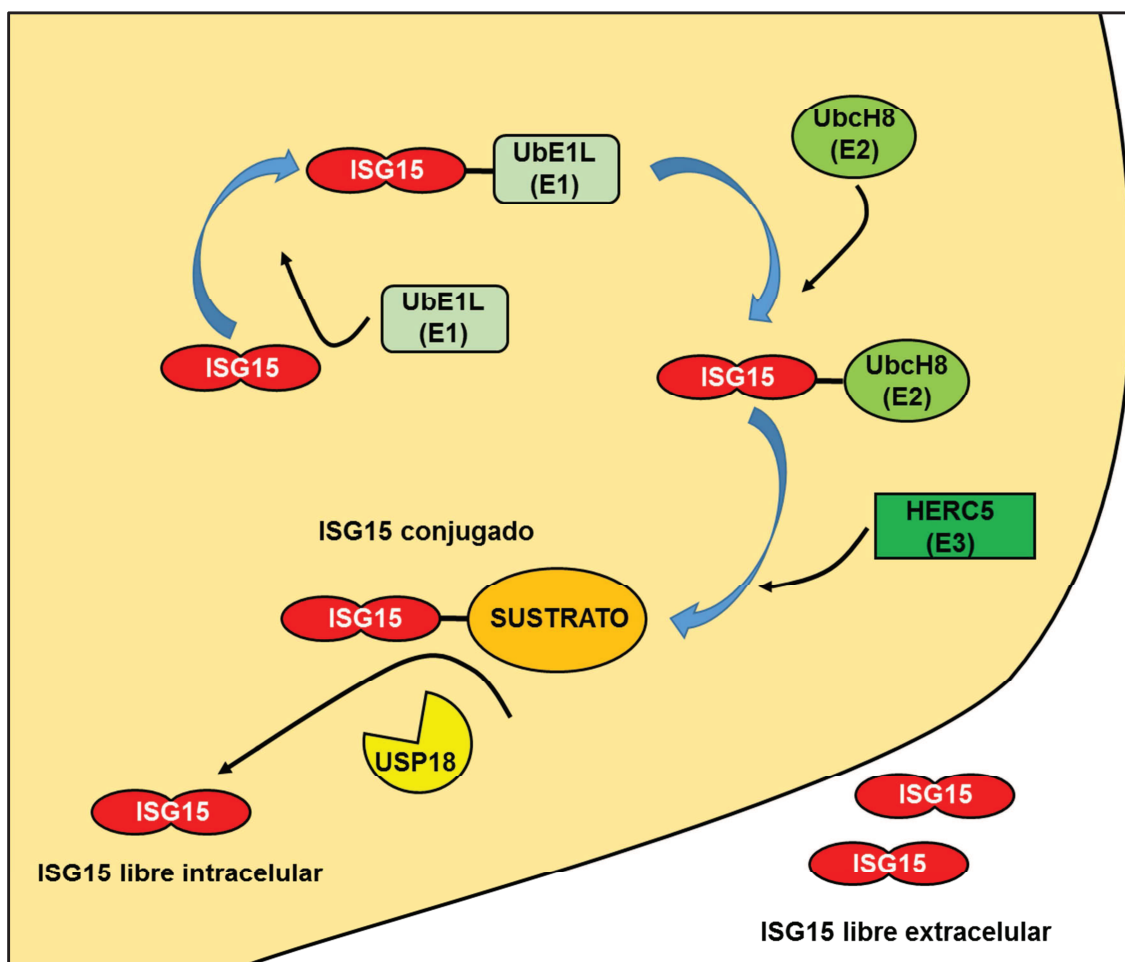


Figura 6. Representación esquemática del proceso de ISGilación

2.3.2. La ISGilación es un proceso reversible.

Una de las características comunes de la ubiquitinación y la ISGilación es que ambos procesos son reversibles. En el caso de la ubiquitinación, existen alrededor de 79 enzimas deubiquitininasas (DUBs) agrupadas en cinco familias: UCH, USP, OTU, Josephin y JAMM. Las enzimas de las cuatro primeras familias son proteasas de cisteína mientras que las pertenecientes a la última son metaloproteasas de zinc. Las DUBs pueden mostrar una alta especificidad de sustrato o ser muy inespecíficas [117]. Algunas DUBs como USP2, USP5, USP13 o USP14 pueden reconocer tanto ubiquitina como ISG15 [118], mientras que USP18, sin embargo, reconoce exclusivamente ISG15 [119].

USP18 es una isopeptidasa inducible por interferón que elimina específicamente los conjugados de ISG15. Su inactivación en ratones de laboratorio ha demostrado aumentar significativamente la ISGilación así como

aumentar la resistencia a la infección por diferentes virus [120]. Además, e independientemente de su acción enzimática, USP18 regula negativamente la ruta del interferón mediante la competición con JAK1 para unirse con el receptor de interferón IFNAR2 [121].

2.3.3. Proteínas diana de ISG15.

Hasta la fecha, se han identificado más de 300 proteínas celulares diana de ISG15 [122]. Muchas de estas proteínas están inducidas por interferón y están implicadas en mecanismos de defensa antiviral, mientras que otras se expresan constitutivamente y están implicadas en numerosos procesos celulares como remodelación de la cromatina, organización del citoesqueleto, respuesta al estrés, transcripción o traducción entre otros [123]. Además, también se ha demostrado la conjugación de ISG15 con proteínas virales como en el caso de la proteína NS1 de Influenza A [124], siendo este un campo donde existe una intensa investigación [125].

2.3.4. La ISGilación afecta mayoritariamente a proteínas de nueva síntesis.

Una característica importante de la reacción de ISGilación, es que se ha demostrado como un proceso ampliamente inespecífico que afecta a proteínas de nueva síntesis y de manera poco eficiente [122]. Esto es debido a que HERC5, la principal enzima E3-ligasa de la reacción, está asociada a ribosomas y por lo tanto es capaz de reconocer de manera inespecífica a una gran cantidad de proteínas en el momento de su síntesis. El hecho de que las proteínas de nueva síntesis en las que se han introducido mutaciones de delección sean igual de susceptibles a la ISGilación, sugiere que no existen determinantes estrictos en la estructura de las proteínas para ser reconocidas como objeto de conjugación de ISG15 [122].

A pesar de el amplio abanico de proteínas que pueden ser diana de ISG15, únicamente un pequeño porcentaje del conjunto de una proteína diana determinada es objeto de ISGilación [123]. Esto, sin embargo, no implica que el papel de la ISGilación no sea determinante en muchos casos. Por ejemplo, experimentos realizados en el virus del papiloma humano demuestran que la ISGilación de únicamente el 10% de la proteína L1 de la cápside durante la replicación, hace disminuir en un 70% su infectividad [122].

2.3.5. Función de la ISG15.

Normalmente, la ubiquitina se conjuga mediante la unión de ésta a uno o multiples residuos de lisina de la proteína diana. Adicionalmente, y puesto que que esta molécula contiene siete residuos de lisina, se pueden formar cadenas de ubiquitina definidas por la posición del aminoácido de lisina en el que se da la unión. Dependiendo de que la modificación de la proteína diana se de por monoubiquitinación o poliubiquitinación, así como del tipo de cadenas de ubiquitina que se formen, su destino puede ser la degradación en el proteosoma o la alteración de su función o localización dentro de la célula [126]. En el caso de ISG15, no existe evidencia de que se formen cadenas, aunque sí se pueden modificar varias lisinas dentro de una misma proteína. Tampoco se ha observado la degradación en el proteosoma de las proteínas a las que se conjuga. Aunque sólo se conoce la función de ISG15 en un número limitado de proteínas diana, parece estar relacionada con la modificación de la actividad de la proteína, bien sea ganando o perdiendo una función, alterando su estabilidad, o provocando un cambio en su localización [97, 107, 127, 128].

2.4. Papel antiviral de ISG15.

Tanto en su forma libre como en su forma conjugada, se ha descrito que ISG15 tiene un papel importante en la respuesta inmune inata que se desencadena tras el reconocimiento por parte la célula de la infección de un patógeno. En el caso de infecciones virales, y aunque los mecanismos no se conocen en su totalidad, existen estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que describen el papel antiviral de ISG15 frente a numerosos virus como el VIH, ébola, chikungunya, vaccinia, herpes, influenza A, sindbis, coronavirus o dengue entre otros [129-135], aunque en el caso del virus de la hepatitis C también se ha descrito un efecto proviral [136-138]. Los principales mecanismos de acción conocidos mediante los cuales ISG15 ejerce su efecto protector frente a las infecciones vírales son: la inhibición de la salida del virus, la conjugación con proteínas virales y la modificación de proteínas celulares.

Como primer ejemplo, ISG15 es capaz de inhibir los procesos de ubiquitinación necesarios para que el VIH se libere de la célula. El VIH se libera al exterior celular utilizando el sistema de transporte vesicular de la célula mediado por el complejo ESCRT (Complejo de Clasificación Endosomal

Requerido para el Transporte). Esta maquinaria se compone de cuatro complejos (ESCRT-0, -I, -II y -III) compuestos a su vez por varias subunidades. ISG15 impide que la proteína Gag del VIH se conjugue con ubiquitina e interaccione con Tsg101, una subunidad del complejo ESCRT-I con actividad E2 conjugadora. Esta interacción se ha demostrado como esencial para el transporte del virus mediante el sistema de endosomas hasta el exterior celular [129, 139]. Mecanismos similares se han descrito también en la inhibición por parte de ISG15 de la liberación del virus ébola [130].

En segundo lugar, se ha descrito la interacción de ISG15 con la proteína NS1 del virus de la influenza A. Esta proteína viral no estructural funciona como un antagonista del interferón y es uno de los principales mecanismos de evasión de este virus. ISG15 se conjuga mediante la unión a un aminoácido de lisina situado en la posición 41 del dominio de unión a ARN de la proteína NS1 impidiendo la unión de ésta con importina- α , una proteína necesaria para su movilización al núcleo de la célula [124]. La infección con un virus recombinante en el que ese aminoácido está mutado, tiene como efecto una disminución de la ISGilación y un aumento de la replicación viral en células tratadas con IFN- β [124].

Por último, ISG15 se puede conjugar también con numerosas proteínas celulares implicadas en la respuesta antiviral entre las que están STAT1, JAK1, RIG-I, IFIT1 o PKR, lo que indica que la respuesta mediada por ISG15 es probable que sea de amplio espectro en cuanto a los procesos en los que interviene y los microorganismos a los que puede afectar [107]. Un ejemplo concreto es la estabilización por parte de ISG15 del factor de transcripción IRF3, responsable de promover la inducción de interferón. La unión de ISG15 inhibe la unión a IRF3 de Pin1, una proteína que promueve su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. Se ha demostrado mediante experimentos *in vitro* que la estabilización de IRF3 por parte de ISG15 tiene como resultado el aumento de la respuesta antiviral mediada por este receptor en el contexto de una infección por el virus Sendai [128].

2.5. Mecanismos de evasión viral frente a ISG15.

La importancia del papel antiviral de ISG15 se demuestra por el hecho de que existen numerosos virus que han desarrollado estrategias para evadir su acción. Estas estrategias están encaminadas fundamentalmente a impedir la formación de conjugados de ISG15 o bien a eliminarlos una vez que se han formado.

La primera descripción de un mecanismo de evasión frente a ISG15 fue la de la proteína NS1 del virus influenza B [110]. Aunque la infección por este virus induce una fuerte expresión de ISG15, no se detectan conjugados. Esto se debe a que la proteína NS1 se une de manera no covalente a ISG15 e inhibe su activación por parte de UbEL1 y por consiguiente la reacción de ISGilación [110].

Un segundo ejemplo de evasión viral frente a ISG15 se ha demostrado con el virus vaccinia [132, 140]. La proteína E3L de este virus, implicada en contrarrestar la respuesta celular mediada por interferón, es capaz de unirse a ISG15 e inhibir la formación de conjugados, aunque el mecanismo todavía no se conoce con exactitud. En este contexto, las cepas de vaccinia silvestres replican con la misma eficacia en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) tanto silvestres como ISG15^{-/-}. A su vez, los ratones ISG15^{-/-} no muestran tampoco una mayor letalidad que los silvestres después de la infección. Sin embargo, las cepas de vaccinia con el gen E3L deletado (Δ E3L) sí que inducen la formación de conjugados de ISG15 tras infectar MEFs silvestres, y los ratones ISG15^{-/-} se muestran mucho más susceptibles a la infección por este virus que los ratones silvestres [132, 140], demostrando así la eficacia de la estrategia de evasión inmune de vaccinia.

En último lugar, se ha descrito que diferentes virus, pertenecientes incluso a familias con una gran distancia taxonómica entre ellas, codifican enzimas deubiquitininas capaces de eliminar la unión de ISG15 a sus proteínas diana. Tanto la proteína L del virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo, como la proteína nsp2 del virus de la arteritis equina constan de dominios OTU con función deubiquitinasa y deISGilasa [141]. La expresión de estos dominios OTU en ratones transgénicos, así como mediante un virus sindbis recombinante, es capaz de inhibir la función antiviral de ISG15 frente a este virus [141]. El amplio espectro de acción descrito de estas proteínas

sugiere su implicación en la inhibición de numerosos procesos inmunes dependientes de ubiquitina e ISG15.

III. OBJETIVOS.

OBJETIVOS.

A pesar de la numerosa investigación realizada en el campo, todavía no se ha conseguido ninguna vacuna ni ningún tratamiento eficaz capaz de controlar la infección por el VRSH, en gran parte debido a nuestro escaso conocimiento de la respuesta inmune frente al virus y cómo ésta se relaciona con la gravedad de la enfermedad. Aunque el papel que ejercen proteínas como ISG15 en la respuesta inmune innata frente al VRSH es desconocido hasta el momento, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado una fuerte inducción *in vitro* de ISG15 como consecuencia de la infección por este virus que podría tener relevancia en la respuesta antiviral.

Por todo ello, en este trabajo propusimos los siguientes objetivos:

1. Analizar la inducción de ISG15 y la formación de conjugados a lo largo de la infección por el VRSH en cultivos celulares.
2. Investigar el efecto de la alteración de la expresión de ISG15 en la replicación del VRSH en esos cultivos.
3. Generar líneas de células A549 “knockout” para ISG15 y estudiar en ellas la replicación del VRSH.
4. Definir si el mecanismo de acción de ISG15 frente al VRSH es dependiente de ISG15 unida o es mediado por ISG15 libre.
5. Analizar la expresión de ISG15 en epitelios pseudoestratificados generados *in vitro* a partir de explantes de pulmón humano y en lavados nasofaríngeos de niños infectados con el virus, como primer paso para entender el posible papel de ISG15 *in vivo*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIALES.

1.1. Material biológico.

1.1.1 Líneas celulares establecidas.

Las líneas celulares usadas en este trabajo fueron las siguientes:

- HEp-2. Número ATCC: CCL-23. Línea celular establecida que deriva de células HeLa (células epiteliales humanas de carcinoma de cérvix).
- A549. Número ATCC: CCL-185. Línea celular establecida que deriva de células basales epiteliales de un adenocarcinoma alveolar humano.

1.1.2. Epitelios pseudoestratificados.

Este sistema se basa en la diferenciación *in vitro*, a partir de muestras humanas del tracto respiratorio, de un epitelio pseudoestratificado respiratorio similar al que existe *in vivo*. Este epitelio consta de varias capas y diferentes tipos celulares, incluidas células ciliares y células secretoras de moco.

Los tejidos se obtuvieron a partir de seis donantes. Estos donantes fueron pacientes ex-fumadores aquejados de cáncer pulmonar, y sin ninguna otra patología asociada, a los que se les había extirpado un pulmón. En el momento de la operación el funcionamiento pulmonar estaba dentro de los límites normales por espirometría. Ninguno de los pacientes estaban tratados crónicamente con teofilina, agonistas de receptores β -adrenérgicos, corticosteroides, o drogas anticolinérgicas. Los experimentos fueron aprobados por el comité de ética y se obtuvo un consentimiento informado.

1.1.3. Lavados nasofaríngeos.

Se obtuvieron muestras, tanto en el ingreso como en el alta hospitalaria, procedentes de 19 niños menores de 24 meses infectados con el VRSH y afectados de bronquiolitis. El periodo de tiempo transcurrido entre el ingreso y el alta varió mayoritariamente entre uno y seis días. En todos los casos se obtuvo el consentimiento de los padres o tutores legales previamente a la

inclusión de los niños en el estudio. A su vez, se obtuvo la aprobación del comité ético del Hospital Clínico de Valladolid con anterioridad al comienzo del reclutamiento de los pacientes.

1.1.4. Virus.

Se utilizó la cepa Long (grupo antigénico A) del *virus respiratorio sincitial humano* aislada por primera vez en 1956 en Baltimore (Estados Unidos).

1.1.5. Bacterias.

La cepa bacteriana empleada para el crecimiento de los plásmidos utilizados en este trabajo fue *Escherichia coli* DH5 α .

1.1.6. Plásmidos.

Los plásmidos empleados en este trabajo se resumen a continuación:

- **pCMV6-Neo:** Plásmido control generado en el laboratorio mediante la liberación del inserto del plásmido comercial de expresión eucariota pCMV6-Neo-TNFAIP3 (Origene). Este plásmido contiene los promotores del fago T7 y el citomegalovirus humano (CMV) y los genes de resistencia a ampicilina y neomicina.
- **pCMV6-Neo-ISG15:** Plásmido generado en el laboratorio mediante el clonaje de ISG15 en el plásmido pCMV6-Neo.
- **pCMV6-Neo-ISG15-LRAA:** Plásmido generado en el laboratorio mediante mutagénesis dirigida a partir del plásmido pCMV6-Neo-ISG15. Este plásmido expresa el gen de la proteína ISG15 con una mutación consistente en la sustitución de los dos residuos carboxi-terminales de glicina por dos residuos de alanina.
- **Human-H36698_TALEN_L1 y Human-H36698_TALEN_R1:** Plásmidos comerciales de expresión eucariota que contienen el promotor del CMV, y el gen de resistencia a ampicilina (Talen Library Resource, Seoul National University). Estos plásmidos expresan nucleasas (TALEN, transcription activator-like effector nucleases) [142] que reconocen y cortan secuencias específicas del gen *ISG15*.

1.1.7. Medios de cultivo.

1.1.7.1. Medios de crecimiento de células eucariotas.

- Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Lonza) suplementado con 4mM de L-Glutamina (Lonza), 100 U/ml de penicilina (Lonza), 100 U/ml de estreptomicina (Lonza) y suero fetal bovino (SFB, Biowest) con una concentración del 10% (DMEM10) o el 2% (DMEM2).
- DMEM-agar. Medio DMEM2 preparado con una concentración final del 0,7% de agarosa (Low melting sieve agarose, CONDA).
- OPTIMEM. Suministrado por GIBCO.
- Tripsina-verseno. 0,25 % tripsina, 0,02% EDTA en PBS.

1.1.7.2. Medios de crecimiento de bacterias.

- Medio LB líquido. 1% bacto-triptona, 0,05% extracto de levadura y 1% NaCl (MP Biomedicals).
- Medio LB agar. 1% bacto-triptona, 0,05% extracto de levadura, 0,05% NaCl y 1,5% de agar (CONDA, Pronadisa).

1.2. Reactivos.

1.2.1. Anticuerpos.

Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las siguientes proteínas:

- ISG15 (H150sc-50366, Santa Cruz). Anticuerpo policlonal de conejo.
- β -actina (8224-100, Abcam). Anticuerpo monoclonal de ratón.
- Fosfoproteína del VRSH (67P) [143]
- Glicoproteína G del VRSH (021/1G) [144].
- Proteína de Fusión F del VRSH (476-510) [143].
- Nucleoproteína del VRSH (79N) [143].
- Anticuerpo secundario anti-ratón (97040, Abcam)
- Anticuerpo secundario anti-conejo (6721, Abcam)

1.2.2. ARNs de interferencia pequeños (ARNip).

Se utilizaron ARNip dirigidos contra los siguientes genes:

- *ISG15* (s18524, Ambion).

- *UbE1L* (s14563, Ambion).
- *USP18* (s22260, Ambion).
- Control negativo (4390846, Ambion)

1.2.3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	DIANA
pCMV6-F	ATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAC	pCMV6-Neo
pCMV6-R	GAGGCAGGAGAATCGCTTGAACC	pCMV6-Neo
ISG15NotI-F2	AAAAGCGGCCGCGGTGCTGCCTGCCGAAG	ISG15
ISG15NotI-R	AAAAGCGGCCGCTCTTTACAACAGCCTTTATTTC	ISG15
pISG15-F1	AAGTGAGCGGGCTGGAGGGTG	ISG15
pISG15-R1	CCGCCTCTTTACAACAGCCTTTATTTC	ISG15
TALEN ISG15-F1	GAGCAGCTCCATGTCGGTGTC	ISG15
TALEN ISG15-R1	ACACGGTGCTCAGGGGCTTG	ISG15
F-pISG15MUT	CCTGCGGGCAGCCGGCACAGAGCCTGGCGGGCGGAGC	ISG15
R-pISG15MUT	GGCTGCCCCGAGGCGCAGATTCATGAACACGGT	ISG15

Tabla 1. Secuencia y características de los oligonucleótidos empleados en este trabajo.

1.2.4. Sondas qRT-PCR.

Las sondas empleadas en este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

NOMBRE	GEN DIANA	REFERENCIA	ESPECIE	CASA COMERCIAL
Longnucleo-ANY	<i>Nucleoproteína</i>	Ensayo a demanda *	VRSH	Applied Biosystems
ACTB	<i>Actina-β</i>	Hs99999903_m1	Humano	Applied Biosystems
DDX58	<i>RIG-I</i>	Hs00204833_m1	Humano	Applied Biosystems
HERC5	<i>HERC5</i>	Hs00180943_m1	Humano	Applied Biosystems
IFIT1	<i>IFIT1</i>	Hs00356631_g1	Humano	Applied Biosystems
ISG15	<i>ISG15</i>	Hs00192713_m1	Humano	Applied Biosystems
UBA7	<i>UbE1L</i>	Hs00163295_m1	Humano	Applied Biosystems
UBE2L6	<i>UbcH8</i>	Hs01125548_m1	Humano	Applied Biosystems

Tabla 2. Sondas comerciales empleadas en este trabajo. * La secuencia de los oligonucleótidos y la sonda específicos para la nucleoproteína son:

- Oligonucleótido directo 5'CATGATTCTCCTGATTGTGGGATGA3';
- Oligonucleótido reverso 5'TCACGGCTGTAAGACCAGATCTAT3';
- Sonda 5'CCCCTGCTGCCAATTT3'.

1.2.5. Tampones.

- Tampón TBF-I (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM CH₃CO₂K, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol, pH 5,5).
- Tampón TBF-II (10 mM MOPS, 10mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol, pH 6,5)
- Tampón TNE (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA).
- Tampón de lisis Tritón-Deoxicolato (10 mM Tris HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% tritón X-100, 1% deoxicolato sódico).
- Tampón ELISA (25 mM Citrato, 50 mM Fosfato, pH 5.0).
- Tampón PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄)
- Tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA).
- Tampón de electroforesis de proteínas (2,5 mM Tris base, 19,2 mM Glicina, 0,01% SDS).
- Tampón de transferencia de proteínas (2,5 mM Tris base, 19,2 mM Glicina).
- Tampón de carga de proteínas (62,5 mM Tris-HCl, 10% glicerol, 2% SDS, 1% β-mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol).
- Tampón de carga de ADN (0,05% azul de bromofenol, 6,8% glicerol)

1.2.6. Otros reactivos.

- Purificación y titulación de virus: Sacarosa (Merck), metanol (Merck), formaldehído (FA, Merck), dimetilsulfóxido (DMSO, Merck), 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, SIGMA-ALDRICH), albúmina sérica bovina (BSA, Amresco), polietilenglicol 6000 (PEG-6000 Merck).
- Cuantificación de proteínas y western blot: Reactivo de Bradford (BIORAD), temed (BIORAD), persulfato de amonio (PSA, BIORAD), dodecilsulfato sódico (SDS, BIORAD), acrilamida-bisacrilamida (BIORAD), ECL (Clarity western ECL substrate, BIORAD), tween20 (AMRESCO), agente de bloqueo (ECL Advance blocking reagent, GE Healthcare)
- Generación de bacterias competentes y clonaje: Acetato potásico (SIGMA-ALDRICH), cloruro de rubidio (SIGMA-ALDRICH), cloruro de

calcio (Merck), cloruro de magnesio (Merck), glicerol (Merck), MOPS (SIGMA-ALDRICH), carbenicilina, (Calbiochem).

- Transfecciones y tratamientos celulares. Lipofectamina 2000 (INVITROGEN), Lipofectamina RNAiMax (INVITROGEN), interferón- β -1a humano (IFN- β , pbl assay science).

2. MÉTODOS.

2.1. Manipulación de células y virus.

2.1.1. Cultivos celulares.

2.1.1.1. Mantenimiento y conservación.

Las células A549 y HEP2 se sembraron en placas petri con medio DMEM10 y se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. El subcultivo de las células se realizó desprendiendo las monocapas celulares con tripsina-verseno.

Para su conservación, las células se resuspendieron en SFB con un 10% de DMSO y se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido.

2.1.1.2. Recogida de muestras celulares.

Para la extracción de ARN o proteínas, se retiró el sobrenadante de cultivo, se levantaron las células con tripsina-verseno (para ARN) o EDTA (para proteínas) y se centrifugaron a 1500 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, se lavó el sedimento con PBS y se volvió a centrifugar utilizando las mismas condiciones. El sedimento obtenido se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

2.1.2. Virus.

2.1.2.1. Infección con el VRSH.

Las infecciones con el VRSH se realizaron mediante la inoculación del virus sobre monocapas de células A549 o HEP-2 con la multiplicidad de

infección deseada. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con DMEM2 y se añadió el inóculo del virus en DMEM2. Tras 90 minutos de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo, se añadió medio DMEM2 fresco y se incubaron las células a 37°C durante el tiempo requerido en cada experimento.

Para la obtención de las muestras de virus procedentes de células infectadas, se retiró el sobrenadante y se clarificó mediante centrifugación a 5000 rpm durante cinco minutos. Una vez clarificado, se guardó el sobrenadante en nitrógeno líquido hasta su posterior análisis. Para obtener los virus asociados a la membrana celular, se retiró el sobrenadante de cultivo, se lavaron las células con DMEM2, se rasparon las células y se disgregaron en DMEM2 mediante pipeteo y sonicación. Posteriormente, se clarificó como se ha descrito con anterioridad y se guardó el sobrenadante en nitrógeno líquido.

2.1.2.2. Purificación del VRSH.

Se infectaron con el VRSH placas subconfluentes de células HEp-2 a una multiplicidad de infección de 0,5 unidades formadoras de placa (ufp) por célula. A las 48 horas, tras observar un claro efecto citopático, se recogieron estas células junto con el sobrenadante y se emplearon para infectar de nuevo una mayor cantidad de células HEp-2. Al cabo de tres días, se precipitó el virus del sobrenadante procedente de la infección añadiendo polietilenglicol 6000 (PEG-6000 Merck) hasta alcanzar una concentración del 10% e incubando durante 90 minutos a 4°C con agitación suave. Posteriormente, se recogió el precipitado mediante centrifugación a 4000 g durante 20 minutos y se resuspendió y homogeneizó en tampón TNE. El sedimento homogeneizado se ultracentrifugó a 150.000 g durante 90 minutos a 4°C en un gradiente discontinuo del 30-45% de sacarosa. Tras este tiempo, se retiró el material localizado en la interfase entre las dos concentraciones de sacarosa, se dividió en alícuotas y se guardó en nitrógeno líquido.

2.1.2.3. Titulación del VRSH.

Se infectaron células HEp-2 crecidas en placas de seis pocillos con diluciones seriadas del VRSH. Tras 90 minutos de adsorción, se retiró el inóculo, se añadió DMEM-agar, y una vez solidificado, se incubaron las placas durante cinco días a 37°C. Transcurrido este tiempo, se fijaron las células

durante 40 minutos con formaldehído al 4% en tampón PBS y seguidamente se permeabilizaron con metanol durante cinco minutos. Tras bloquear los sitios de unión inespecíficos con BSA al 1% en tampón PBS, se incubó durante una hora a temperatura ambiente con una mezcla de anticuerpos primarios frente al VRSH generados en ratón [60]. Tras realizar tres lavados del anticuerpo primario con agua, se incubó durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-ratón-HRP (horseradish peroxidase). El revelado de las placas de lisis se realizó con un sustrato compuesto por tampón ELISA, 3-Amino-9-ethylcarbazol (0,0002%) y peróxido de hidrógeno (0,002%). Tras 20 minutos en oscuridad se procedió al conteo de las placas de lisis.

2.1.3. Generación *in vitro* de epitelios pseudoestratificados.

Esta parte del trabajo se desarrolló en colaboración con el Hospital Clínico Universitario de Valencia donde se llevaron a cabo los cultivos celulares, la infección de los mismos y la recogida de las muestras a distintos días post-infección. Las células bronquiales humanas procedentes de los explantes de pulmón se diferenciaron de la siguiente forma: se sembraron $8,25 \times 10^4$ células en pocillos de $0,3 \text{ cm}^2$ (Transwell inserts, Corning Costar, High Wycombe, UK). Posteriormente, se sumergieron en medio de diferenciación (50% DMEM en medio BEMG (Clonetics, Wokingham, UK) durante los primeros siete días y finalmente, se cultivaron aproximadamente durante 21 días más con la superficie apical expuesta al aire. Durante este tiempo se inspeccionó la actividad ciliar diariamente hasta que se alcanzó la máxima densidad de células ciliadas. A continuación, los cultivos se lavaron tres veces con medio de diferenciación fresco y se infectaron con la cepa Long del VRSH a una multiplicidad de infección aproximada de $7 \times 10^6 \text{ ufp/cm}^2$. Los cultivos se incubaron durante dos horas a 37°C y se lavaron una vez con medio de diferenciación. La infección se mantuvo durante varios días cambiando el medio cada 48 horas [145]. Finalmente, se recogieron las muestras a los días indicados y se realizó una extracción de ARN con TRIzol (Invitrogen) y posterior purificación con el kit comercial “RNeasy Mini Kit” (Qiagen). Se recibieron un total de seis muestras de pacientes, cinco de ellas recogidas en los días dos y cuatro post-infección y una muestra recogida el tercer día de infección.

2.1.4. Toma de muestras de lavados nasofaríngeos.

Los lavados nasofaríngeos se obtuvieron mediante instilación de 2,5 ml de solución salina isotónica (NaCl 0.9%) en las fosas nasales de niños infectados con el VRSH. La toma de las muestras se realizó en el Hospital Clínico de Valladolid en distintas etapas de la enfermedad (ingreso y alta hospitalaria). El ARN total se extrajo con TRIzol y se purificó posteriormente con el kit “RNeasy Mini Kit” (Qiagen).

2.2. Manipulación de bacterias.

2.2.1. Generación de bacterias competentes.

Se crecieron bacterias *E. coli* DH5 α en medio LB con agitación hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,3 y 0,6 a 600 nm. Posteriormente, se enfriaron las células cinco minutos en hielo y se centrifugaron a 3000 rpm y 4°C durante 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió suavemente en 50 ml de tampón TBF-I por cada 100 ml de cultivo inicial, se enfriaron durante cinco minutos en hielo y se centrifugaron nuevamente con las mismas condiciones anteriores. El nuevo sedimento se resuspendió suavemente en cuatro ml de tampón TBF-II por cada 100 ml de cultivo inicial y se mantuvo en hielo durante un mínimo de 15 minutos. Las bacterias se repartieron en alícuotas de 50 μ l siempre mantenidas en hielo y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

2.2.2. Transformación de bacterias competentes.

Se descongelaron durante 20 minutos en hielo 50 μ l de bacterias *E. coli* DH5 α competentes. Se añadieron a las bacterias 5 ng de plásmido o 2 μ l de una mezcla de ligación y se incubaron durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, se calentaron las bacterias a 42°C durante 1,5 minutos y seguidamente se volvieron a incubar en hielo durante un minuto. Tras este paso, se añadió a la mezcla anterior 0,5 ml de medio LB, se incubaron los tubos en agitación a 37°C durante 30 minutos, se extendieron distintas cantidades del medio LB líquido con las bacterias en placas de medio LB sólido

con 50 µg/ml de carbenicillina y se incubaron las placas en estufa a 37°C durante 18 horas.

2.2.3. Cultivo y conservación de bacterias.

Las bacterias portadoras del plásmido de interés se extendieron en placas de medio LB sólido con 50 µg/ml de carbenicillina y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Las colonias aisladas se crecieron en agitación en medio LB líquido con la misma concentración de antibiótico a 37°C durante 18 horas.

Las bacterias crecidas en medio LB líquido se conservaron añadiendo glicerol hasta una concentración final del 20% y posteriormente se almacenaron a -80°C.

2.3. Manipulación de ARN.

2.3.1. Extracción de ARN de células eucariotas.

La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante el kit comercial “RNeasy Mini Kit” (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad de ARN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU) y se almacenó a -20° C hasta su uso.

2.3.2. Reacción de la transcriptasa reversa.

Se generó ADN complementario al ARN mediante transcripción reversa con oligonucleótidos aleatorios mediante el kit comercial “High-Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de muestras de ARN con una concentración ajustada a 0,05 µg/µl y se utilizó un programa estándar consistente en 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

2.4. Manipulación de ADN.

2.4.1. Extracción de ADN de células eucariotas.

La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial “Cyclo-Prep Genomic DNA Purification kit” (Amresco) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y se almacenó a -20° C hasta su uso.

2.4.2. Extracción de plásmidos de bacterias.

Las colonias aisladas seleccionadas se sembraron en caldo LB con 50 µg/ml de carbenicilina durante 18 horas. Posteriormente, se centrifugaron a alta velocidad para obtener el sedimento. La extracción de los plásmidos de interés a partir de las bacterias transformadas se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante mediante los kits comerciales “QIAprep Spin Miniprep Kit” o “EndoFree Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN) a partir de 4 ml o 100 ml de cultivo original respectivamente. La cantidad de ADN obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y se almacenó a -20° C hasta su uso.

2.4.3. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR se realizaron mediante el kit comercial “PuReTaq Ready-to-go PCR beads” (GE Healthcare) a partir de 100 ng de ADN purificado y 5 pmoles de cada oligonucleótido específico. El programa de ciclos de PCR se diseñó específicamente para cada fragmento de ADN a amplificar.

2.4.4. RT-PCR cuantitativa.

Las reacciones se llevaron a cabo con el termociclador “StepOne Real-Time PCR System” (Applied Biosystems). Cada reacción se realizó por triplicado usando la solución madre “TaqMan Universal PCR master mix 2X” (Applied Biosystems), 2,5 µl de una sonda Taqman específica de cada gen (Applied Biosystems) (Tabla 2), 3 µl de ADN complementario (ADNc) específico

y agua libre de ARNasas hasta completar el volumen final de 50 μ l. Se utilizó un programa estándar consistente en 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C. La expresión de los genes estudiados se normalizó respecto de la expresión de actina- β utilizando para realizar las cuantificaciones relativas el método comparativo CT ($\Delta\Delta$ CT) mediante el software StepOne versión 2.1.

2.4.5. Secuenciación de ADN.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el servicio de secuenciación del Centro Nacional de Microbiología con 6 pmoles de cada cebador específico, partiendo de 1 ng por cada 100 pares de bases de producto de PCR o de 150 ng por cada 4 kb de plásmido purificado.

2.4.6. Generación de plásmidos.

2.4.6.1. Plásmido control.

Se generó el plásmido control pCMV6-Neo mediante la liberación del inserto del plásmido pCMV6-Neo-TNFAIP3 suministrado por Origene. Para ello, 1 μ g del plásmido pCMV6-Neo-TNFAIP3 purificado se digirió con 1 μ l de la enzima “FastDigest NotI” (Fermentas) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, el producto de la digestión se corrió mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, se recortó la banda perteneciente al vector y se extrajo el ADN de la agarosa mediante el kit comercial “QUIAEX Gel Extraction Kit” (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, se llevó a cabo una reacción de ligación del vector digerido usando el kit comercial “Rapid DNA Ligation Kit” (Roche) siguiendo el protocolo del fabricante y se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes con una décima parte de esta reacción. Por último, se realizó una extracción de plásmidos de las bacterias transformadas y se comprobó su movilidad en comparación con el plásmido original mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Los plásmidos seleccionados se secuenciaron con los oligonucleótidos pCMV6-F y pCMV6-R (Tabla 1) para confirmar que no tenían

inserto. Se conservaron a -80°C alícuotas de las bacterias portadoras del plásmido pCMV6-Neo hasta su posterior uso.

2.4.6.2. Clonaje de ISG15.

Se realizó una transcripción reversa de ARN mensajeros a partir de una muestra de ARN extraído de células A549 infectadas con el VRSH. Para ello, se utilizaron oligos dT con el kit comercial “High-Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems) según las recomendaciones del fabricante. A partir del ADNc obtenido, se amplificó por PCR el gen *ISG15* (NM_005101.3) con los oligonucleótidos específicos ISG15NotIF e ISG15NotIR (tabla 1) que incluían la secuencia de la diana de restricción NotI en su extremo 5'. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 5 minutos a 94°C , 25 ciclos de 30 segundos a 94°C , 30 segundos a 56°C y un minuto a 72°C , y 7 minutos a 72°C . Se secuenció el producto de PCR obtenido con el objetivo de comprobar que la secuencia de *ISG15* fuese la correcta. Posteriormente, se digirieron con la enzima NotI (Fermentas) tanto el plásmido pCMV6-Neo como el producto de PCR obtenido. En el caso del plásmido, y con el objeto de evitar procesos de religado, el producto de la digestión se trató con fosfatasa alcalina (USB® Shrimp Alkaline Phosphatase, Affimetrix) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción de ligación se llevó a cabo con una relación de tres moles de inserto por cada mol de vector utilizando el kit comercial “Rapid DNA Ligation Kit” (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se transformaron bacterias competentes con una décima parte de la reacción y se extrajeron los plásmidos de una selección de las colonias obtenidas para comparar su movilidad electroforética con respecto al plásmido original. Por último, se secuenciaron los plásmidos con los oligonucleótidos pCMV6-F y pCMV6-R y se seleccionaron aquellos en los que el inserto estaba en la orientación correcta y la secuencia no tenía ningún tipo de mutación con respecto a la secuencia original descrita de *ISG15*. Las bacterias portadoras de los plásmidos positivos se conservaron a -80°C para su posterior uso.

2.4.6.3. Generación mediante mutagénesis dirigida de un plásmido que expresa ISG15 no conjugante.

Se generó un plásmido que expresaba el gen *ISG15* mutado (pCMV6-Neo-ISG15-LRAA) a partir del plásmido pCMV6-Neo-ISG15. Se diseñaron los oligonucleótidos específicos F-pISG15mut y R-pISG15mut (tabla 1) para mutar dos glicinas a alaninas en las posiciones 156 y 157 de la proteína mediante una reacción de PCR. Para ello, se utilizó el kit comercial “Phusion Site-directed Mutagenesis kit” (Thermo Scientific) según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se transformaron bacterias competentes con el plásmido resultante del proceso de mutagénesis dirigida, se extrajeron plásmidos de una selección de colonias y se secuenció el gen *ISG15* con los cebadores pCMV6-F y pCMV6-R. Las bacterias que portaban el plásmido en el que se introdujo la mutación deseada se conservaron a -80°C para su posterior uso.

2.5. Manipulación de proteínas.

2.5.1. Extracción de proteínas totales.

Las muestras celulares recogidas para la extracción de proteínas se resuspendieron por pipeteo en tampón de lisis tritón-deoxicolato. Posteriormente, se mantuvieron 10 minutos en hielo agitando levemente en vortex cada tres minutos, se centrifugaron a 4°C a máxima velocidad y se guardaron los sobrenadantes congelados a -80°C.

2.5.2. Cuantificación de proteínas.

Se determinó la concentración de los extractos de proteína utilizando una curva patrón de BSA realizada con distintas concentraciones entre 0,5 µg/µl y 0,1 µg/µl. Las muestras problema se diluyeron 20 veces en agua destilada y posteriormente se añadió 1 ml del reactivo colorante (Quick Start Bradford Dye Reagent, BIO-RAD) sobre 20 µl de cada una de estas diluciones así como de las distintas concentraciones de BSA. Posteriormente, se incubaron todas las muestras 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se leyó su densidad óptica a 595 nm. Las concentraciones de las proteínas

se calcularon por extrapolación en la curva patrón de BSA utilizando el programa informático GraphPad Prism 6.

2.5.3. Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE e inmunodetección (Western blot).

Las muestras de proteína fueron analizadas mediante la técnica de electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). El porcentaje de acrilamida utilizado varió entre un 10-15% dependiendo del peso molecular de la proteína analizada. Se cargaron un total de 10-20 µg de proteína por cada muestra y se llevó a cabo la electroforesis en tampón de electroforesis. Posteriormente, se transfirieron las proteínas durante dos horas a una membrana immobilon (Milipore) mediante electrotransferencia húmeda usando un tampón de transferencia. Una vez terminada la transferencia se saturó la membrana durante una hora a temperatura ambiente con un agente de bloqueo comercial (ECL Advance blocking reagent, GE Healthcare) diluido al 3% en tampón PBS con un 0,05% de Tween-20 (BIO-RAD). Las incubaciones con los anticuerpos primarios y secundarios se realizaron durante una hora a temperatura ambiente. Los lavados intermedios se realizaron con PBS-tween 0,05%. Finalmente, para la visualización de las proteínas, la membrana se incubó con sustrato ECL (Clarity Western ECL Substrate, Biorad) y se reveló mediante la detección de quimioluminiscencia en el equipo Gel Logic 1500 Imaging System instrument (Kodak). La intensidad de las bandas de proteínas se cuantificó mediante el programa informático Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) normalizando la señal frente la obtenida para la β -actina.

2.6. Ensayos de silenciamiento.

Para los ensayos de silenciamiento, se sembraron pocillos M24 con 5×10^4 células A549 en DMEM10 sin antibiótico con 24 horas de antelación para alcanzar una confluencia aproximada del 50%. Las células se transfectaron añadiendo sobre el sobrenadante de cultivo una mezcla de medio OPTIMEM (Gibco) con lipofectamina RNAiMax (Invitrogen) y los ARNiP control o específicos (ISG15, UBA7, USP18) a una concentración de 10 nM. Tras 24

horas de transfección, se infectaron las células con el VRSH a una multiplicidad de infección de tres ufp/célula. En el caso de las células tratadas con interferón, se retiró el medio de cultivo cuatro horas después de la transfección y se añadió medio fresco con 500 U/ml de IFN- β (pbl assay science). El IFN- β se mantuvo a partir de entonces durante todo el proceso de infección. Se recogieron muestras a distintos tiempos post-infección, tanto de células para analizar ARN y proteína, como de sobrenadante de cultivo para titulación viral.

2.7. Sobreexpresión de ISG15.

Los ensayos de sobreexpresión se realizaron en placas M12 con 5×10^4 células A549 por pocillo sembradas en DMEM10 sin antibiótico con una antelación de 60 horas para alcanzar el estado de subconfluencia. Las células se transfectaron añadiendo al sobrenadante cultivo 200 μ l por pocillo de una mezcla de medio OPTIMEM, 4 μ l lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 1 μ g del plásmido purificado que expresaba la proteína ISG15. Cinco horas después de la transfección se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. Tras 24 horas de transfección, se infectaron las células con el VRSH a una multiplicidad de infección de tres ufp/célula. Se recogieron muestras a distintos tiempos post-infección, tanto de células para el análisis de ARN y proteína, como de sobrenadante de cultivo para titulación viral.

2.8. Generación de células knockout para ISG15.

Se generaron líneas celulares knockout (KO) de A549 para el gen *ISG15* mediante la tecnología TALEN. Esta tecnología permite la generación de células KO mediante la expresión intracelular de nucleasas capaces de reconocer y cortar secuencias específicas de un gen determinado [142]. Las células se transfectaron con los plásmidos Human-H36698_TALEN_L1 and Human-H36698_TALEN_R1 (Tabla 1). Tres días después de la transfección, se levantaron las células con tripsina y se clonaron por dilución límite en placas de 96 pocillos a una densidad de una célula por placa. Se seleccionaron los pocillos en los que se observaron clones individuales de células y se expandieron sucesivamente en pocillos de mayor tamaño, hasta alcanzar un número suficiente de células para poder ser analizadas. La identificación de

clones KO se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos TALEN-ISG15-F1 y TALEN-ISG15-R1 utilizando el siguiente programa: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C y un minuto a 72°C, y 7 minutos finales de extensión a 72°C. Los productos de PCR fueron secuenciados posteriormente y analizados con el software Lasergene v7.2. Los clones KO obtenidos se confirmaron posteriormente por western blot utilizando anticuerpos específicos frente a ISG15. Los clones seleccionados se sometieron a una segunda clonación y una nueva confirmación mediante PCR, secuenciación y western blot. Como controles negativos, se seleccionaron varios clones celulares salvajes que habían sufrido el mismo proceso de transfección y clonaje.

2.9. Estadística.

El análisis estadístico de los datos para determinar la significancia de las diferencias encontradas entre las distintas condiciones experimentales se realizó mediante la prueba t de Student. Se consideraron significativos valores de p menores de 0,05. Para correlacionar la expresión de ISG15 con la replicación viral, se realizó una regresión lineal y un análisis de correlación de Pearson.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa informático GraphPad Prism 6.

V. RESULTADOS.

RESULTADOS.

1. EXPRESIÓN DE ISG15 E ISGILACIÓN EN CÉLULAS A549 INFECTADAS CON EL VRSH.

1.1. La infección por el VRSH induce la expresión de ISG15 y de las enzimas implicadas en el proceso de ISGilación.

Con el objetivo de comprobar si la infección *in vitro* por el VRSH inducía la expresión de ISG15, se realizó una cinética de infección con este virus en células A549. Para ello, se infectaron las células a una multiplicidad de infección de tres ufp/célula y se recogieron muestras a diferentes tiempos post-infección (0, 3, 6, 16, 24, 36 y 48 horas). En los distintos tiempos analizados, se cuantificaron por qRT-PCR los niveles de ARNm de los genes *ISG15*, *UbE1L*, *UbchH8* y *HERC5* en comparación con células no infectadas. Como marcador de la infección, se analizó el ARN total perteneciente al gen de la nucleoproteína viral.

La infección por el VRSH produjo un aumento de la acumulación de ARNm de ISG15. Este aumento fue dependiente del tiempo de infección y se empezó a hacer evidente entre las 6 y las 16 horas, a partir de las cuales, el incremento fue continuo hasta alcanzar los niveles máximos de expresión a 48 horas post-infección (más de 950 veces respecto a células no infectadas) (Figura 7A).

En cuanto a la expresión de los genes que codifican para las enzimas que intervienen en el proceso de ISGilación, en todos los casos esta fue menor que la observada para ISG15, aunque la cinética fue similar. En el caso de UbE1L (E1, activadora), los valores de ARNm comenzaron a incrementarse entre las 6 y las 16 horas, alcanzando los niveles máximos después de 36 horas post-infección (55 veces respecto de células no infectadas) (Figura 7B). La expresión de UbchH8 (E2, conjugadora) no sufrió apenas incremento hasta las 24 horas y alcanzó los niveles máximos a 36 horas post-infección (15 veces respecto de células no infectadas) (Figura 7C). Los niveles de expresión de HERC5 (E3, ligasa) fueron los más altos de los tres. Estos aumentaron entre

las 6 y las 16 horas y alcanzaron unos niveles máximos (200 veces respecto de células no infectadas) a las 48 horas post-infección (Figura 7D).

Estos resultados muestran que la infección del VRSH en células A549 induce fuertemente la acumulación de ISG15 a nivel de ARNm, así como de las enzimas Ube1L, UBE2L6 y HERC5 necesarias para el proceso de ISGilación.

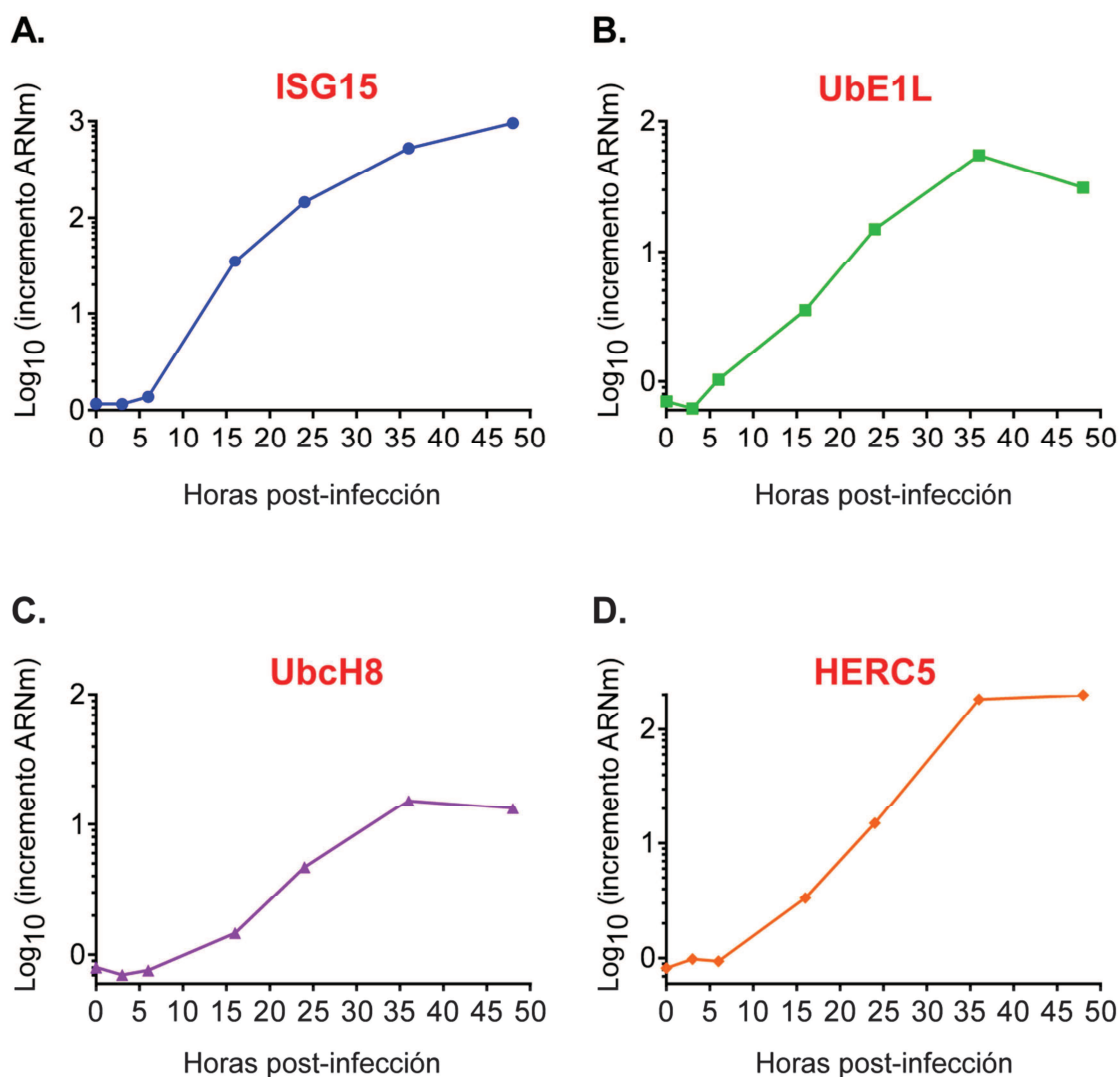


Figura 7. Cinética de acumulación de ISG15, Ube1L, UbcH8 y HERC5 tras la infección con el VRSH. Los datos representan en cada uno de los tiempos analizados, el número de veces de incremento en la cantidad de ARNm de cada uno de los genes respecto de células no infectadas.

En lo referente a los niveles de la nucleoproteína viral, se detectó un aumento ya a partir de las tres horas post-infección con respecto a los valores

medidos en el tiempo cero (tras 90 minutos de adsorción). Este incremento fue continuo durante todo el proceso de infección alcanzando unos valores máximos de más de 4.000 veces a las 48 horas post-infección (Figura 8A).

Representando los niveles de expresión de ISG15 obtenidos anteriormente (Figura 7A) junto con los de la nucleoproteína viral, se observó un retraso en la expresión de ISG15 con respecto a la nucleoproteína de alrededor de cinco horas (Figura 8A). Además, los resultados mostraron también una alta correlación positiva entre los valores de expresión de la nucleoproteína viral y los de ISG15 ($R^2=0,97$, $P<0,0001$) (Figura 8B), indicando que ISG15 es inducido por la infección del VRSH.

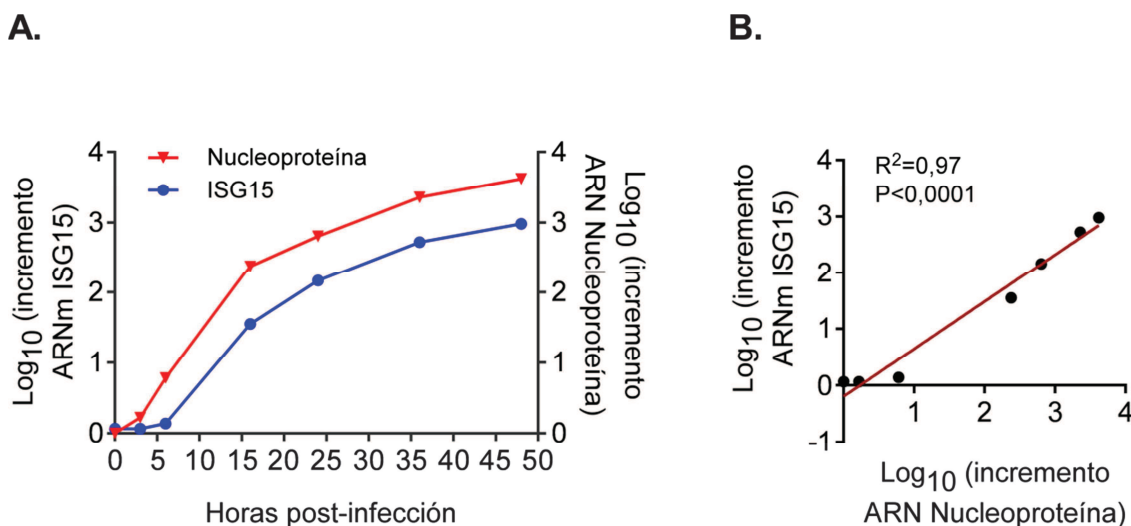


Figura 8. A) Cinética de acumulación de ISG15 en comparación con la nucleoproteína viral. Los datos representan en cada uno de los tiempos analizados, el número de veces de incremento en la cantidad de ARNm de ISG15 con respecto a células no infectadas, y de la nucleoproteína viral respecto al tiempo cero de infección. B) Regresión lineal de los datos representados en la gráfica 8A.

1.2. La infección por el VRSH promueve la ISGilación de proteínas.

Para confirmar los resultados anteriores y determinar si los niveles obtenidos a nivel de ARNm se trasladaban a nivel de acumulación de proteínas, se realizó una nueva infección en células A549 en las mismas condiciones en las que se había realizado anteriormente y se analizaron muestras mediante western blot a diferentes tiempos post-infección (4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42 y 48 horas).

La señal de la nucleoproteína viral se comenzó a visualizar ya a las 4 horas post-infección, aunque lo hizo más claramente a las 12 horas post-infección, incrementando posteriormente de forma continua durante las 48 horas de la infección. Las células infectadas expresaron grandes cantidades de ISG15 tanto en forma libre como conjugada a otras proteínas. La acumulación de ISG15 libre fue continua a lo largo de la infección y se empezó a visualizar claramente a partir de las 16 horas, mientras que los conjugados no se observaron hasta las 30-36 horas. Al igual que se observó a nivel de ARNm, la acumulación de la proteína ISG15 mostró un retraso de aproximadamente cuatro-cinco horas con respecto a la acumulación de la nucleoproteína viral (Figura 9A).

Por último, se compararon por western blot los patrones de bandas de conjugados de ISG15 obtenidos en células A549 tras 48 horas de infección con el VRSH a una multiplicidad de infección de tres ufp/célula o tras 48 horas de tratamiento con IFN- β (500 U/ml). Los resultados mostraron tanto bandas con igual movilidad electroforética en los dos tratamientos como bandas específicas de cada uno de ellos. Esto indica que la infección por el VRSH induce la conjugación de ISG15 a proteínas diana específicas y diferentes de las que se obtienen mediante el tratamiento con IFN- β (Figura 9B).

Por tanto, estos datos indican que el VRSH es capaz de inducir la síntesis de ISG15 de forma libre, así como la ISGilación específica de proteínas.

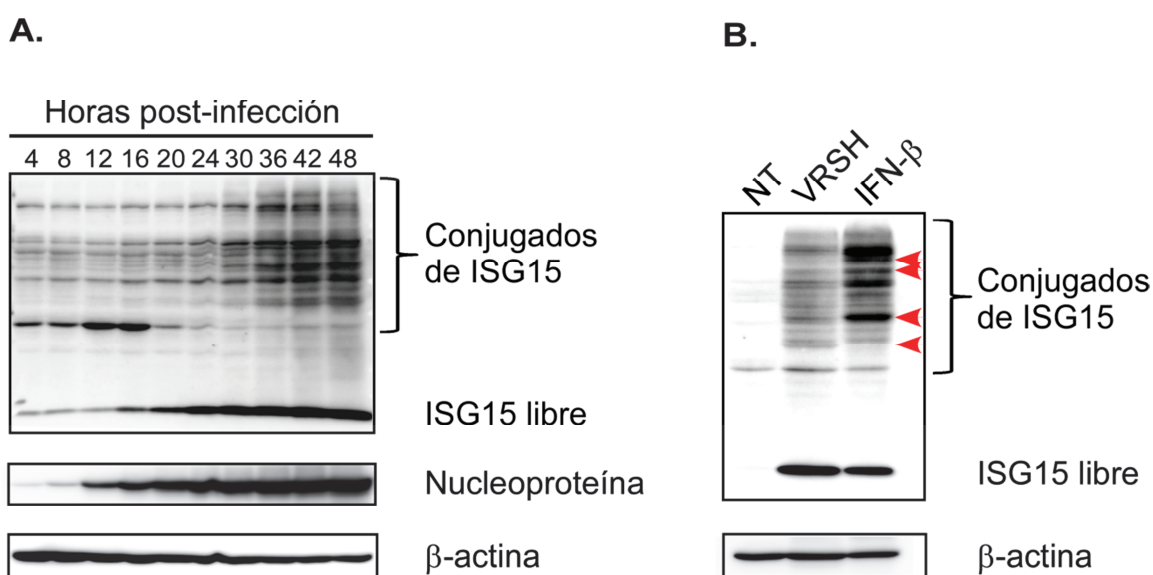


Figura 9. A) Análisis por western blot de la acumulación de proteínas mediante anticuerpos específicos frente a ISG15 y la nucleoproteína viral. Se normalizaron los datos utilizando un anticuerpo específico frente la β -actina. B) comparación por western blot de los patrones de ISGilación en células A549 no tratadas (NT), tras 48 horas de infección con el VRSH (VRSH) o tras 48 horas de estimulación con IFN- β (IFN- β). Las flechas muestran proteínas conjugadas con ISG15 específicas del tratamiento realizado.

2. EFECTO DE LA REDUCCIÓN O INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ISG15 EN LA INFECCIÓN POR EL VRSH.

2.1. El silenciamiento de ISG15 en células estimuladas con IFN- β aumenta el título y la acumulación de ARN y proteínas virales.

Para analizar el posible papel antiviral de ISG15, se silenciaron células A549 con ARNs de interferencia específicos frente a ISG15 o ARNs de interferencia control. Posteriormente, se infectaron con el VRSH a una multiplicidad de tres ufp/célula. Tras el análisis de los títulos virales de los sobrenadantes a las 48 horas post-infección, no se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones (Figura 10A –IFN- β). Debido a que los resultados de los experimentos previos mostraban un retraso significativo tanto de la síntesis de ISG15 como de la formación de conjugados con respecto a la replicación viral, se pensó en la hipótesis de que este retraso fuera el responsable de la falta de actividad antiviral mostrada en los experimentos. Para aclarar esta cuestión, se repitió el ensayo de silenciamiento anterior y se indujo la expresión de ISG15 previamente a la infección mediante la estimulación de las células con IFN- β . Como era de esperar, en las células tratadas con IFN- β en ambas condiciones se produjo una disminución del título viral tras 48 horas de infección en comparación con las células no tratadas (Figura 10A +IFN- β). Sin embargo, en las células tratadas con IFN- β en las que se silenció ISG15, se observó un aumento del título viral de 2,9 veces respecto a las células transfectadas con un ARNip control (Figura 10A +IFN- β). Este resultado muestra un papel antiviral de ISG15 frente al VRSH que no tiene lugar en el caso de las células silenciadas.

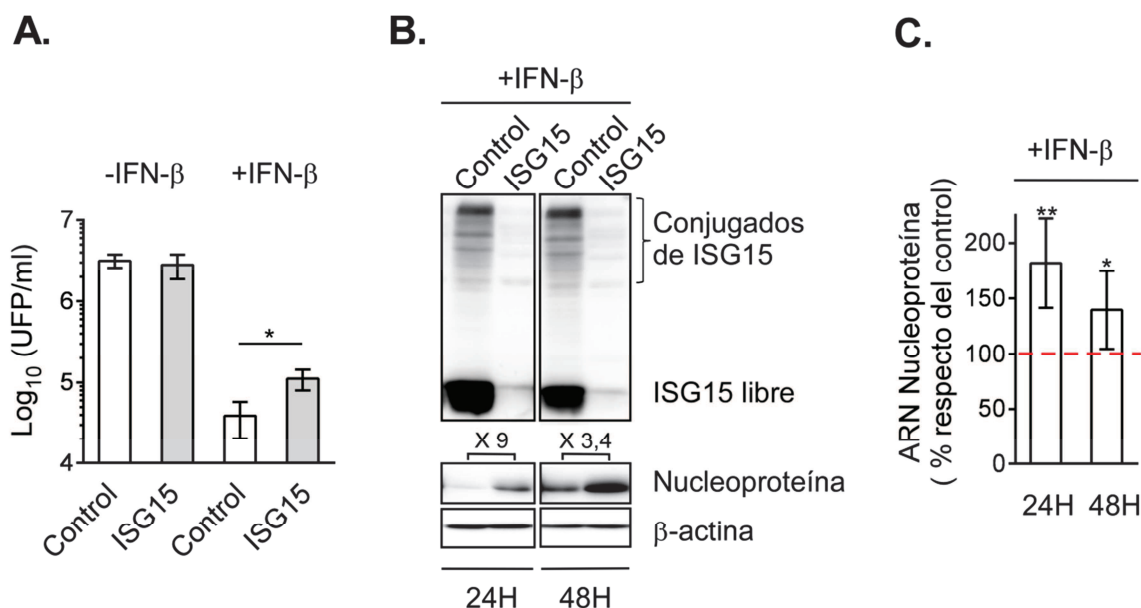


Figura 10. A) Título viral de los sobrenadantes recogidos tras 48 horas de infección con el VRSH en células A549 transfectadas con ARNip control o específicos frente a ISG15. La transfección e infección se realizó en ausencia o presencia de IFN- β . En el caso del tratamiento con IFN- β , el medio de cultivo se sustituyó cuatro horas después de la transfección con medio fresco con 500 U/ml de IFN- β y se mantuvo durante toda la infección. B) Comparación por western blot de la acumulación de ISG15 y la nucleoproteína viral en células A549 silenciadas para ISG15 y células control, infectadas con el VRSH. Las muestras se analizaron mediante anticuerpos específicos frente a ISG15 y la nucleoproteína viral. La normalización y cuantificación se realizó utilizando un anticuerpo específico frente a la β -actina. Se muestran los resultados de un experimento representativo de células tratadas con IFN- β a las 24 y 48 horas post-infección. C) Cuantificación por qRT-PCR del ARN de la nucleoproteína viral en células tratadas con IFN- β e infectadas con el VRSH. Se muestran los valores de células silenciadas para ISG15 como porcentaje respecto de células control. Los datos de A) y C) representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Además de la producción de virus infeccioso, se analizó la acumulación de ISG15 y de la nucleoproteína viral a nivel de proteína y de ARN a 24 y 48 horas post-infección. Las células silenciadas estimuladas previamente con IFN- β mostraron por western blot una clara disminución tanto de ISG15 libre como de ISG15 conjugado en comparación con las células transfectadas con un ARNip control tanto a 24 como a 48 horas (Figura 10B). Esto, a su vez, se

correspondió con un claro aumento de la acumulación de nucleoproteína viral en los mismos tiempos (Figura 10B). De la misma manera, se observó en las células silenciadas un aumento estadísticamente significativo de la acumulación del ARN total perteneciente a la nucleoproteína viral en comparación con las células control (Figura 10C).

Estos resultados, confirmaron que ISG15 ejerce un papel antiviral frente al VRSH afectando a la producción de ARNs y proteínas virales.

2.2. El título del VRSH aumenta en células “knockout” para ISG15 previamente estimuladas con IFN-B.

Para validar y confirmar los resultados anteriores, se generaron mediante la tecnología de nucleasas TALEN dos clones mutantes de células A549 incapaces de expresar la proteína ISG15 (ISG15^{-/-}). A su vez, se seleccionaron como controles otros dos clones de células A549 silvestres (ISG15^{+/+}) que sufrieron el mismo proceso de transfección y selección que las células ISG15^{-/-}. Estos cuatro clones junto con las células A549 sin clonar, se utilizaron para realizar los experimentos (Figura 11A).

Tanto las células ISG15^{-/-} como las ISG15^{+/+} se infectaron a una multiplicidad de tres ufp/célula en presencia y en ausencia de IFN-β y se determinaron los títulos virales tras 48 horas de infección mediante un ensayo de formación de placas. Al igual que sucedió en las células silenciadas, no se observaron diferencias significativas en el título viral entre las células silvestres y las células ISG15^{-/-} que no habían sido tratadas previamente con IFN-β. Sin embargo, en las células tratadas con IFN-β, sí se observaron incrementos estadísticamente significativos en el título viral en las células ISG15^{-/-} en comparación con las células silvestres. Estos incrementos oscilaron entre 1,9 y 4,9 veces de diferencia (Figura 5B).

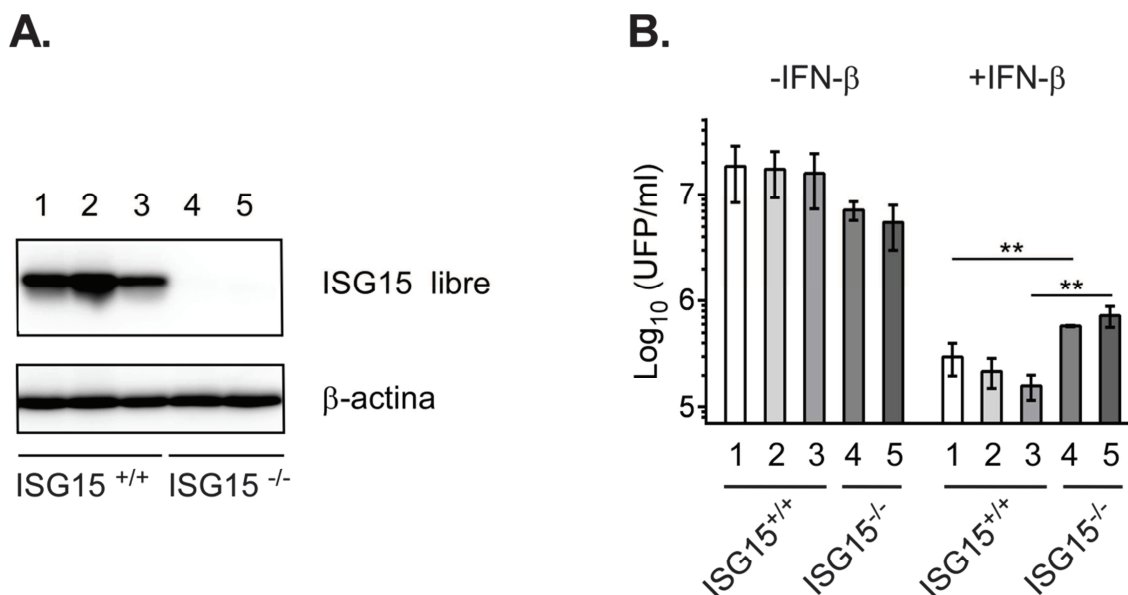


Figura 11. A) Generación de clones ISG15^{-/-} mediante la tecnología TALEN. Se comprobó la expresión de ISG15 mediante western blot utilizando anticuerpos específicos frente a esta proteína. Se generaron dos líneas ISG15^{-/-} de células A549 (líneas 4 y 5) y se incluyeron como controles células A549 silvestres no clonadas (línea 1) y dos líneas de células A549 silvestres clonadas (líneas 2 y 3). B) Título viral tras 48 horas de infección con el VRSH (3 ufp/célula) en células A549 ISG15^{+/+} (líneas 1, 2 y 3) o ISG15^{-/-} (líneas 4 y 5) en ausencia o presencia de IFN-β. Los datos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. ** P< 0,01.

Posteriormente, con el fin de comprobar si los efectos de ISG15 frente al VRSH se veían afectados por la multiplicidad a la que se realizaba la infección, se realizaron los mismos experimentos con dos clones seleccionados (clon 3 ISG15^{+/+} y clon 5 ISG15^{-/-}) a las multiplicidades de infección de 0,3 y 30 ufp/célula. Los resultados de las células tratadas con IFN-β mostraron un mayor aumento del título viral en el clon ISG15^{-/-} con respecto al clon silvestre cuando la infección se realizó a una multiplicidad de 0,3 ufp/célula (9,4 veces) (Figura 12A). Cuando la multiplicidad fue de 30 ufp/célula, también se observaron diferencias significativas aunque de menor magnitud (1,9 veces) (Figura 12B). En el caso de las células que no se estimularon previamente con IFN-β, no se encontraron diferencias significativas en el título viral entre los clones a ninguna de las multiplicidades utilizadas (Figura 12A, 12B).

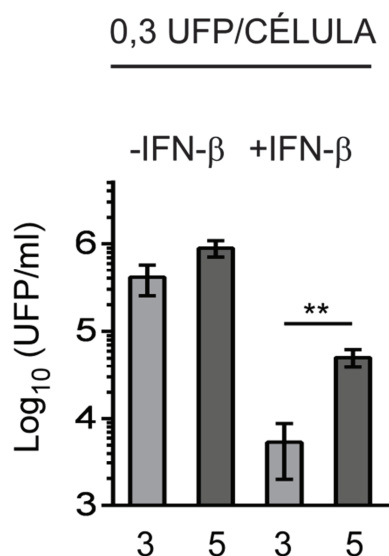
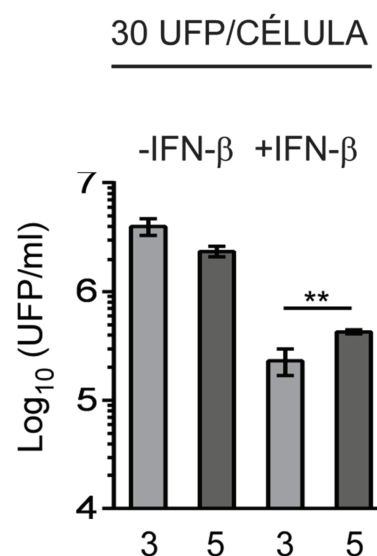
A.**B.**

Figura 12. Título viral tras 72 horas de infección con el VRSH a una multiplicidad de infección de 0,3 ufp/célula (A) o tras 48 horas de infección a 30 ufp/célula (B). Las infecciones se realizaron en células A549 ISG15^{+/+} (línea 3) o ISG15^{-/-} (línea 5) en ausencia o presencia de IFN- β . Los datos representan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes en cada condición. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. ** P < 0,01.

Estos resultados, en su conjunto, confirman el papel antiviral de ISG15 en células estimuladas previamente con IFN- β e indican que el efecto tiende a ser mayor cuando la multiplicidad de infección disminuye, un resultado esperable de un bloqueo parcial de la replicación viral como el ejercido por ISG15.

3. EFECTO DEL AUMENTO DE EXPRESIÓN DE ISG15 EN LA INFECCIÓN POR EL VRSH.

Los resultados de las secciones anteriores mostraron que, a pesar de los altos niveles de ISG15 inducidos como consecuencia de la infección por el VRSH en células A549, no se detectó ninguna actividad antiviral atribuible a esta proteína. Esta actividad, sin embargo, sí se hizo evidente al sobreexpresar ISG15 previamente a la infección mediante la estimulación de las células con

IFN- β . Esto podría ser debido a que ISG15 necesitara de la colaboración de otras proteínas también inducidas por interferón para ser funcional, o podría ser un problema del momento de la infección en la que ISG15 se induce.

Para dilucidar si alguna de estas posibilidades, o una combinación de ambas, era la responsable, se transfectaron células A549 con un plásmido que sobreexpresaba ISG15 o con un plásmido vacío que se usó como control, y posteriormente se infectaron con el VRSH a una multiplicidad de tres ufp/célula. Tras 48 horas de infección, se observó una reducción estadísticamente significativa en el título viral en los sobrenadantes pertenecientes a las células con sobreexpresión de ISG15 (4,9 veces) en comparación con las células transfectadas con el plásmido control (Figura 13).

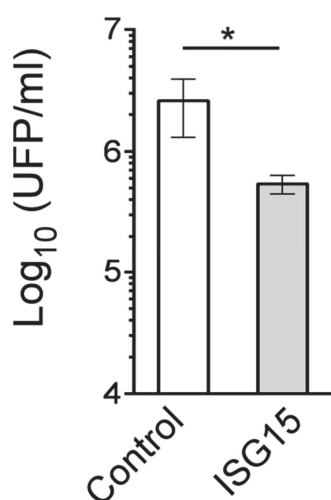


Figura 13. Título viral tras 48 horas de infección con el VRSH en células con sobreexpresión de ISG15 o en células control. Los datos representan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes en cada condición. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. * $P < 0,05$.

Además del título viral, se analizó y cuantificó por western blot el efecto de ISG15 en la acumulación de distintas proteínas virales (G, P, F y N) a 24 y 48 horas post-infección. En todos los casos, se observó una clara disminución de la acumulación de estas proteínas en las células con sobreexpresión de ISG15 en comparación con las células control. Esta disminución fue siempre más evidente a las 24 horas post-infección (Figura 14).

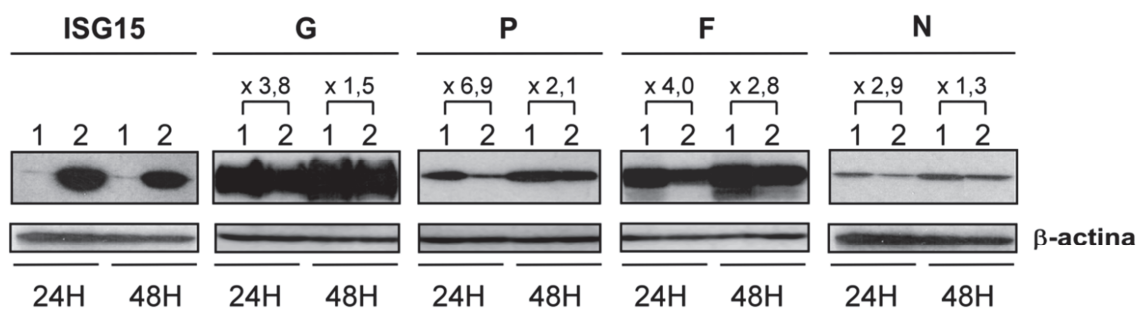


Figura 14. Análisis por western blot de la acumulación de ISG15 y proteínas virales (G, P, F y N) a 24 y 48 horas post-infección mediante anticuerpos específicos. Se muestran los resultados de un experimento representativo de sobreexpresión de ISG15. 1; células transfectadas con un plásmido control, 2; células transfectadas con un plásmido con sobreexpresión de ISG15. La normalización y cuantificación se realizó utilizando anticuerpos específicos frente a β-actina.

Por último, también se analizó por qRT-PCR el efecto de la sobreexpresión de ISG15 en la acumulación del ARN total perteneciente a la nucleoproteína viral (N) en los mismos tiempos mencionados anteriormente. Los resultados mostraron a 24 y 48 horas un descenso estadísticamente significativo en las células transfectadas con el plásmido que sobreexpresaba ISG15 en comparación con las células control (Figura 15).

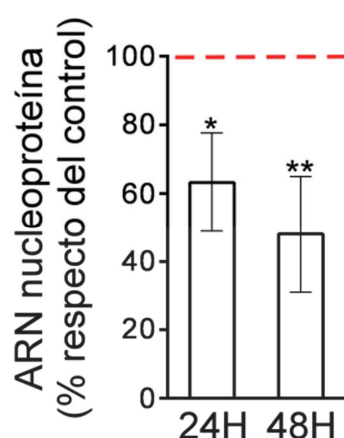


Figura 15. Cuantificación por qRT-PCR del ARN total de la nucleoproteína viral. Se muestran los valores obtenidos en células con sobreexpresión de ISG15 como porcentaje de los obtenidos en células control. Los datos representan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4. LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE ISG15 FRENTE AL VRSH SE DEBE A PROCESOS DE ISGILACIÓN.

Con el objetivo de determinar si el efecto antiviral observado de ISG15 frente al VRSH era debido a procesos de ISGilación, o en cambio se debía a la acción de ISG15 libre, se llevaron a cabo varias aproximaciones experimentales.

4.1. Una proteína ISG15 mutada incapaz de conjugarse a proteínas diana no tiene efecto antiviral.

Debido al papel esencial que juegan las dos últimas glicinas del extremo carboxi-terminal de la secuencia aminoacídica de ISG15 en el proceso de ISGilación [104-106], se decidió generar por mutagénesis dirigida un plásmido que expresara ISG15 con estas dos posiciones mutadas a dos alaninas y que por tanto no fuera capaz de conjugarse a sus proteínas diana. Previamente a la realización de experimentos de infección, se analizó por western blot la capacidad de este plásmido de generar conjugados de ISG15 después de 24 horas de la transfección. En la figura 16, se comparan los niveles de ISG15 libre y conjugado entre células sin transfectar, células transfectadas con un plásmido control, células transfectadas con un plásmido con expresión de ISG15 silvestre y células transfectadas con un plásmido con expresión de ISG15 mutado. Como se esperaba, solamente el plásmido que expresaba ISG15 silvestre fue capaz de generar conjugados de ISG15 (Figura 16, línea 4). Por su parte, el plásmido que expresaba ISG15 mutado expresó la misma cantidad de ISG15 libre que el anterior, pero no fue capaz de formar conjugados (Figura 16, línea 3).

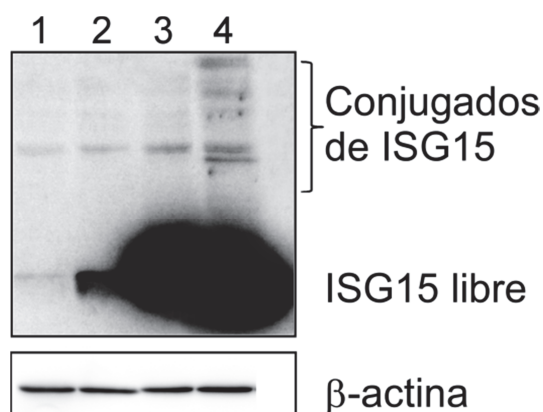


Figura 16. Análisis por western blot de la formación de conjugados de ISG15 y la expresión de ISG15 libre tras 24 horas de las siguientes condiciones: 1; células no transfectadas, 2; células transfectadas con un plásmido control, 3; células transfectadas con un plásmido con expresión de ISG15 mutado, 4; células transfectadas con un plásmido con expresión de ISG15 silvestre. La normalización se realizó utilizando anticuerpos específicos frente a β -actina.

Posteriormente, se realizaron ensayos de infección con el VRSH a una multiplicidad de infección de tres ufp/célula en células A549 transfectadas 24 horas antes con un plásmido vacío, un plásmido con expresión de ISG15 silvestre o un plásmido con expresión de ISG15 mutado. Se recogieron los sobrenadantes tras 48 horas de infección y se titularon por plaqueo. Como era de esperar por los resultados de experimentos anteriores, se observó una disminución significativa del título viral (3,9 veces) en las células que habían sido transfectadas con el plásmido con expresión de ISG15 silvestre en comparación con aquellas transfectadas con el plásmido control (Figura 17A). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los títulos virales de las células transfectadas con el plásmido con expresión de ISG15 mutado y las células transfectadas con el plásmido control (Figura 17A).

Además, se validaron estos resultados realizando los mismos experimentos en células A549 ISG15^{-/-} en donde únicamente era posible la expresión de ISG15 mediante la transfección de los plásmidos descritos anteriormente. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados en las células A549 silvestres ISG15^{+/+}. Las células transfectadas con el plásmido con expresión de ISG15 silvestre mostraron una disminución significativa del título viral (4,2 veces) con respecto a las células transfectadas con el plásmido

control (Figura 17B), mientras que no se observaron diferencias entre estas últimas y aquellas transfectadas con el plásmido que expresaba ISG15 mutado (Figura 17B).

Por lo tanto, estos resultados muestran que la actividad de ISG15 frente al VRSH es dependiente de procesos de ISGilación, no mostrando ningún efecto la forma libre de ISG15. Además, la expresión mediante plásmidos de ISG15 salvaje es capaz de reconstituir el fenotipo de células A549 ISG15^{-/-}.

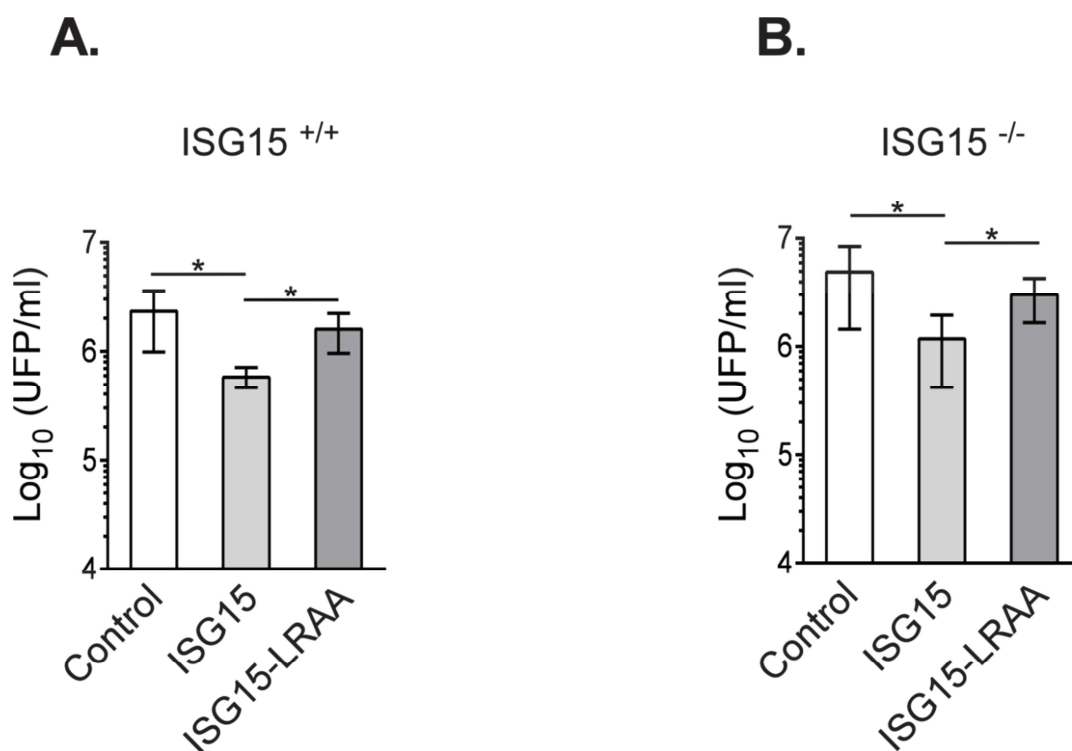


Figura 17. Título viral tras 48 horas de infección con el VRSH en células transfectadas previamente con un plásmido control (Control), un plásmido con expresión de ISG15 silvestre (ISG15) o un plásmido con expresión de ISG15 mutado (ISG15-LRAA). A) Infección en células A549 ISG15^{+/+}. B) Infección en células A549 ISG15^{-/-}. Los datos en A) y B) representan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. * P < 0,05

4.2. El silenciamiento de UbE1L inhibe la formación de conjugados de ISG15 e incrementa el título viral en células infectadas con el VRSH previamente estimuladas con IFN- β .

Como segunda aproximación, y puesto que UbE1L es la única enzima tipo E1 conocida que interviene en el proceso de ISGilación [109, 110], se realizaron ensayos de silenciamiento con el objetivo de inhibir la formación de conjugados de ISG15 en el contexto de la infección por el VRSH. Para ello, se transfectaron células A549 con ARNip específicos frente a UbE1L o con ARNip control en presencia o ausencia de IFN- β y posteriormente se infectaron con el VRSH a una multiplicidad de tres ufp/célula.

Se analizaron por western blot en las células estimuladas con IFN- β tanto la acumulación de ISG15 libre como la formación de conjugados utilizando anticuerpos específicos frente a esta proteína a 24 y 48 horas post-infección. Además, se analizó la acumulación de la nucleoproteína viral en las mismas condiciones y los mismos tiempos. Al igual que sucedió en las células control, las células silenciadas para UbE1L expresaron grandes cantidades de ISG15 libre, sin embargo, no fueron capaces de formar conjugados (Figura 18A). A su vez, de la misma manera que se observó en las células silenciadas para ISG15 (Figura 10B), la inhibición de UbE1L tuvo como consecuencia un aumento importante de la acumulación de la nucleoproteína viral a 24 y 48 horas post-infección (Figura 18A).

Al analizar los títulos virales de los sobrenadantes tras 48 horas de infección, al igual que ocurrió en las células silenciadas para ISG15, en ausencia de IFN- β no se encontraron diferencias entre las células silenciadas para UbE1L y las células control (Figura 18B –IFN- β). Por el contrario, y también de igual manera que en las células silenciadas para ISG15, la inhibición de UbE1L en presencia de IFN- β produjo un aumento significativo del título viral en comparación con las células control (3,9 veces) (Figura 18B +IFN- β).

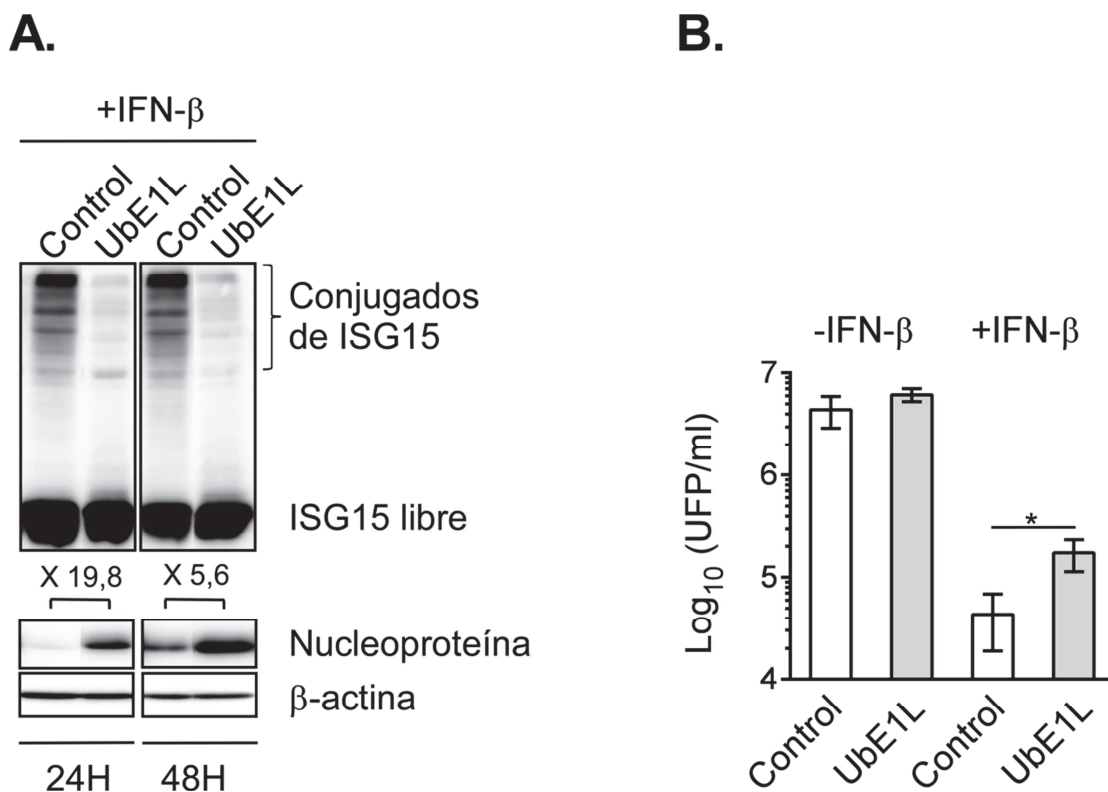


Figura 18. A) Comparación por western blot de la acumulación de ISG15, proteínas ISGiladas y nucleoproteína viral en células A549 silenciadas para UbE1L y células control, infectadas con el VRSH. Las muestras se analizaron mediante anticuerpos específicos frente a ISG15 y la nucleoproteína viral y se normalizaron y cuantificaron utilizando un anticuerpo específico frente a la β -actina. Se muestran los resultados de un experimento representativo de células tratadas con IFN- β a las 24 y 48 horas post-infección. B) Título viral de los sobrenadantes recogidos tras 48 horas de infección con el VRSH en células A549 transfectadas con ARNip control o específicos frente a UbE1L. La transfección e infección se realizó en ausencia o presencia de IFN- β . Los datos representan las medias y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. * $P < 0,05$.

Estos resultados demuestran el papel crucial de UbE1L en la formación de conjugados de ISG15 y confirman la importancia de este proceso en la actividad antiviral frente al VRSH mediada por ISG15.

4.3. El silenciamiento de USP18 aumenta la formación de conjugados de ISG15 y disminuye el título viral en células infectadas con el VRSH previamente estimuladas con IFN- β .

Como última aproximación para determinar si el efecto de ISG15 sobre el VRSH era debido a procesos de ISGilación, se realizaron ensayos de silenciamiento de USP18, una proteasa específica con la capacidad de eliminar los conjugados de ISG15 de sus proteínas diana [119, 146]. Para ello, se transfectaron células A549 con ARNip específicos frente a USP18 o con ARNip control en presencia o ausencia de IFN- β y posteriormente se infectaron con el VRSH a una multiplicidad de infección de tres ufp/célula.

Se analizó la formación de conjugados de ISG15 por western blot en células tratadas con IFN- β mediante anticuerpos específicos a 24 y 48 horas post-infección. En las células en las que se había silenciado USP18, se observó un aumento de la ISGilación en comparación con las células transfectadas con los ARNip control tanto a 24 como a 48 horas post-infección (Figura 19A). Este aumento de los conjugados se correspondió con una clara disminución de la acumulación de la nucleoproteína viral a los mismos tiempos (Figura 19A).

Además, se cuantificó la presencia de virus infectivo en los sobrenadantes de cultivo tras 48 horas de infección. Los resultados mostraron que en ausencia de IFN- β no existieron diferencias entre las células silenciadas para USP18 en comparación con las células control. Sin embargo, en presencia de IFN- β la inhibición de USP18 provocó una disminución significativa del título viral (3,3 veces) con respecto a las células control (Figura 19B).

Estos resultados, por lo tanto, sugieren que la mayor ISGilación observada como consecuencia del silenciamiento de USP18 podría contribuir a la disminución del título viral en células infectadas con el VRSH.

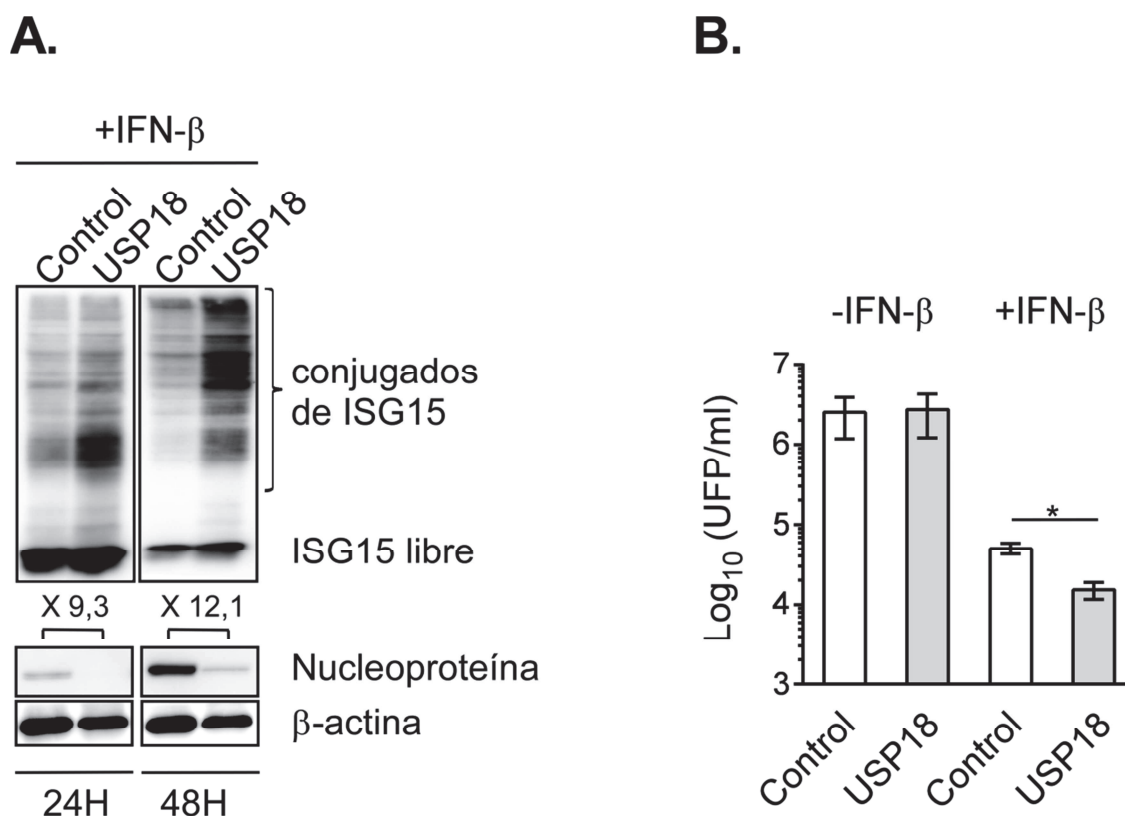


Figura 19. Comparación por western blot de la acumulación de ISG15, proteínas ISGiladas y nucleoproteína viral en células A549 silenciadas para USP18 y células control infectadas con el VRSH. Las muestras se analizaron mediante anticuerpos específicos frente a ISG15 y la nucleoproteína viral y se normalizaron y cuantificaron utilizando un anticuerpo específico frente a la β -actina. Se muestran los resultados de un experimento representativo de células tratadas con IFN- β a las 24 y 48 horas post-infección. B) Título viral de los sobrenadantes recogidos tras 48 horas de infección con el VRSH en células A549 transfectadas con ARNip control o específicos frente a USP18. La transfección e infección se realizó en ausencia o presencia de IFN- β . Los datos representan las medias y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. * P < 0,05.

4.4. El papel de ISG15 como regulador de la respuesta inmune innata no es esencial para su actividad antiviral frente al VRSH.

Además del papel de ISG15 y USP18 en la reacción de ISGilación, ambas proteínas están implicadas en la regulación de la respuesta a interferón. En concreto, USP18 inhibe esta respuesta compitiendo con la proteína JAK1 para unirse con IFNAR2, una de las subunidades del receptor de interferón.

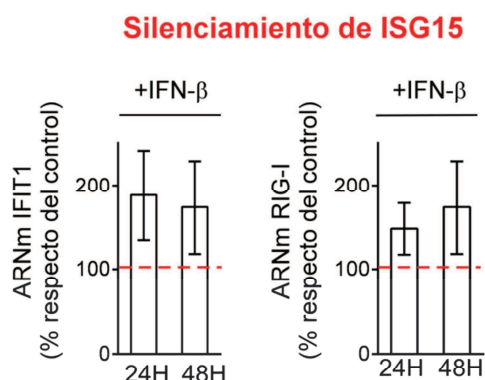
Cuando esto sucede, la ruta se interrumpe con la consecuente disminución de la respuesta antiviral. ISG15 interviene en este proceso mediante la unión a USP18 promoviendo su estabilización e impidiendo su degradación en el proteosoma [103, 121]. Por lo tanto, la proteína USP18 estabilizada por ISG15 regula negativamente la ruta del interferón y la respuesta antiviral.

Adicionalmente a su papel en la ISGilación de proteínas, y dado que ISG15 y USP18 están implicados en la regulación de la respuesta a interferón, se analizó el efecto de los silenciamientos de ISG15, UbE1L y USP18 en esta respuesta. Para ello, en células silenciadas para estos tres genes en presencia de IFN- β e infectadas con el VRSH, se cuantificó por qRT-PCR la expresión de dos genes inducidos por interferón, IFIT1 y RIG-I, que se utilizaron como marcadores.

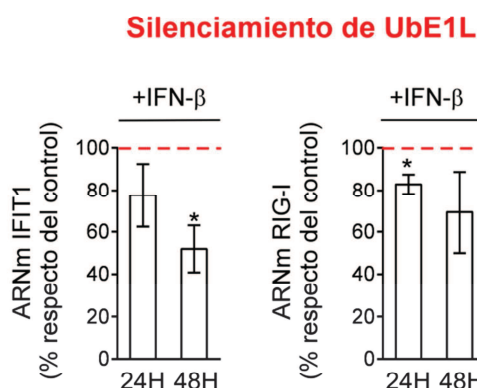
En el caso de las células silenciadas para ISG15 y USP18 se observó un aumento de la expresión de IFIT1 y RIG-I en comparación con las células control tanto a 24 como a 48 horas post-infección, aunque las diferencias no fueron significativas en la mayoría de los casos (Figura 20A, 20C). Por el contrario, en las células silenciadas para UbE1L los resultados mostraron un descenso de la expresión de IFIT1 y RIG-I que tampoco fue significativo en todos los casos.

Aunque los resultados obtenidos respecto a la respuesta a interferón fueron los esperados según lo descrito en la literatura: un aumento en la expresión de IFIT1 y RIG-I en los silenciamientos de ISG15 y USP18 y una disminución en el silenciamiento de UbE1L, los resultados respecto a la replicación del VRSH tuvieron efectos contrarios. Así, el silenciamiento de ISG15 produjo un aumento del título viral (Figura 10A), mientras que el de USP18 produjo una disminución (Figura 19B). Esto indicaría que con respecto a la replicación del VRSH, el efecto de la ISGilación sería predominante sobre el efecto de ISG15 en la regulación de la ruta del interferón.

A.



B.



C.

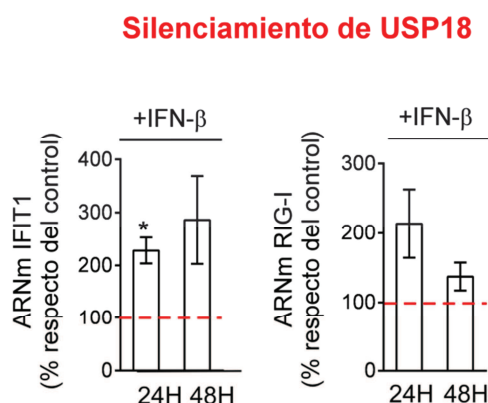


Figura 20. Cuantificación por qRT-PCR de la expresión de los genes IFIT1 y RIG-I en células silenciadas para ISG15 (A), Ube1L (B) y USP18 (C). Células A549 previamente tratadas con IFN- β se silenciaron con ARNip específicos frente a los genes mencionados anteriormente y posteriormente se infectaron con el VRSH. Los resultados se muestran como porcentaje respecto de células control. Los datos representan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. * $P < 0,05$.

5. ESTUDIO DEL POSIBLE PAPEL DE ISG15 EN LA ENTRADA Y LA LIBERACIÓN DEL VRSH DE LA CÉLULA.

Puesto que se ha descrito que el papel antiviral de ISG15 frente a algunos virus es ejercido en distintos pasos del ciclo viral como son la entrada a la célula o bien la liberación de ésta [129, 130, 147], se llevaron a cabo

distintos experimentos de sobreexpresión de ISG15 con el objetivo de comprobar si su acción en solitario era capaz de afectar estos pasos durante la replicación del VRSH.

5.1. ISG15 no afecta a entrada del VRSH en la célula.

Para determinar en qué momento de la infección se manifiesta el efecto inhibitor de ISG15, se transfectaron células A549 con un plásmido con sobreexpresión de ISG15 o con un plásmido control, y posteriormente se infectaron con el VRSH a una multiplicidad de infección de tres ufp/célula. Se recogieron muestras a los tiempos post-infección tempranos de 0, 4 y 8 horas, así como a los tiempos más tardíos de 16, 24 y 48 horas y se cuantificó por qRT-PCR la expresión de la nucleoproteína viral. Los resultados mostraron una reducción de la acumulación del ARN de la nucleoproteína en las células con sobreexpresión de ISG15 en comparación con los controles que comenzó entre las 8 y las 16 horas post-infección, siendo este último tiempo el primero en el que se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 21).

Por lo tanto, estos resultados indican que ISG15 restringe la replicación del VRSH en un paso posterior a la entrada del virus en la célula.

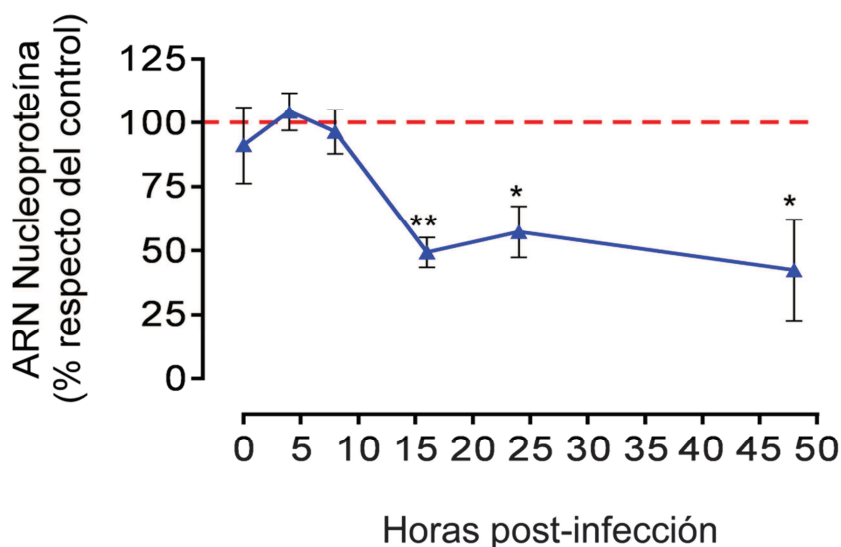


Figura 20. Cuantificación por qRT-PCR de la nucleoproteína viral en células con sobreexpresión de ISG15 infectadas con el VRSH. Los datos se muestran como el porcentaje respecto de células control y representan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. La comparación estadística entre los distintos grupos se realizó mediante t-test. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

5.2. La actividad de ISG15 afecta principalmente a etapas de la replicación del VRSH anteriores a la salida de la célula.

La mayor parte de los viriones del VRSH se encuentran asociados a la membrana celular tras la infección. Para comprobar si ISG15 afectaba a la salida del VRSH de la célula infectada, impidiendo por tanto su liberación, se cuantificó de forma separada el virus liberado en el sobrenadante de cultivo y el que permaneció asociado a la membrana celular (ver métodos). Para ello, se transfectaron células A549 con un plásmido con sobreexpresión de ISG15 o con un plásmido control, se infectaron con el VRSH a una multiplicidad de infección de tres ufp/célula y se recogieron las muestras de las diferentes fracciones tras 48 horas de infección. Los resultados del título viral correspondientes al sobrenadante reprodujeron los resultados mostrados anteriormente (Figura 13, figura 17A), es decir, el título disminuyó significativamente en las células con sobreexpresión de ISG15 en comparación con las células control (Figura 22). De la misma manera, se observó una disminución significativa en el título de los virus asociados a las células con sobreexpresión de ISG15 en comparación con los virus asociados a las células control (Figura 22).

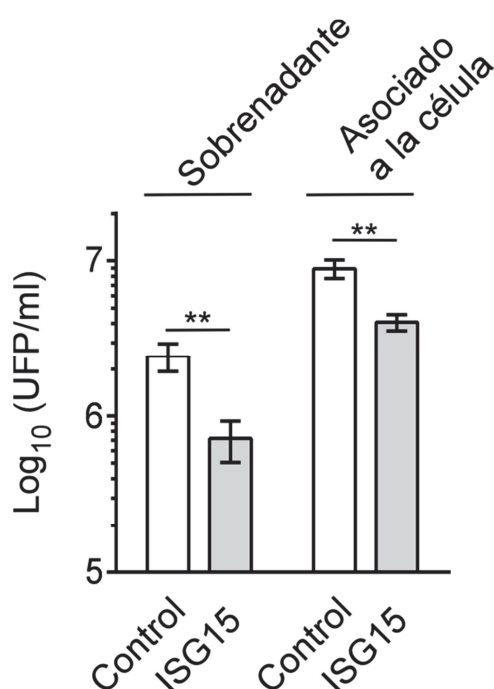


Figura 22. Título viral de los sobrenadantes o de los virus asociados a células tras 48 horas de infección con el VRSH en células con sobreexpresión de ISG15 o en células control. Los datos representan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes en cada condición. La comparación estadística entre las distintas condiciones se realizó mediante t-test. ** $P < 0,01$.

El hecho de que los títulos virales disminuyan en ambas fracciones en unas magnitudes similares, indica que ISG15 ejerce su función en etapas anteriores a la liberación del virus.

6. LA EXPRESIÓN DE ISG15 CORRELACIONA POSITIVAMENTE CON LA EXPRESIÓN DE LA NUCLEOPROTEÍNA VIRAL EN EPITELIOS RESPIRATORIOS GENERADOS *IN VITRO* Y EN LAVADOS NASOFARÍNGEOS DE NIÑOS INFECTADOS

Como una primera aproximación en la investigación de un posible papel de ISG15 en infecciones *in vivo*, se analizó la expresión de ISG15 inducida por la infección del VRSH en modelos relevantes tanto *in vitro* como *in vivo*.

6.1. Epitelios pseudoestratificados.

Como primer modelo de infección se utilizaron epitelios pseudoestratificados diferenciados *in vitro* a partir de explantes de pulmón humano. La elección de este modelo se debió a su similitud con los epitelios pseudoestratificados que existen en el tracto respiratorio *in vivo*, ya que contienen células ciliadas y productoras de moco [145]. Se analizó la expresión de ISG15 en relación con la infección por el VRSH utilizando como marcador de infección la expresión de la nucleoproteína viral. Para ello, se diferenciaron *in vitro* muestras procedentes de explantes de pulmón de seis individuos diferentes, se infectaron con el VRSH y se recogieron muestras a distintos días post-infección (dos y cuatro días en cinco de las muestras y tres días en la muestra restante). Posteriormente, se extrajo el ARN y se cuantificó por qRT-PCR la expresión de ISG15 y la nucleoproteína viral. Para cada una de las muestras y tiempos analizados, se correlacionaron los niveles relativos de ISG15 (obtenidos por comparación con células no infectadas en el mismo tiempo) y los de la nucleoproteína (obtenidos por comparación con la muestra con menor expresión). Los resultados mostraron una alta correlación ($R^2=0,77$, $P<0,0001$) entre la expresión de ISG15 y la infección viral (Figura 23).

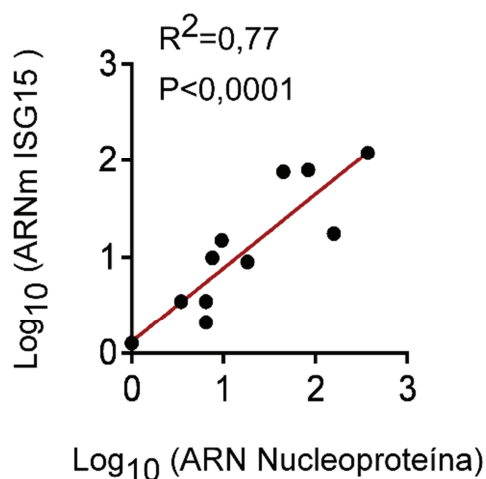


Figura 23. Regresión lineal de la expresión de ISG15 y la nucleoproteína viral en muestras de epitelios pseudoestratificados infectadas con el VRSH. En el eje de abscisas se representa en cada punto el número de veces de la expresión de la nucleoproteína viral respecto de la muestra con el valor más bajo. En el eje de ordenadas se representa en cada muestra y tiempo el número de veces de expresión de ISG15 con respecto a las mismas muestras sin infectar.

6.2. Lavados nasofaríngeos.

Por otro lado, se estudiaron muestras de lavados nasofaríngeos de niños infectados con el VRSH. Se analizaron un total de 38 muestras pertenecientes a 19 pacientes tomadas en el ingreso y el alta hospitalaria. Después de la extracción de ARN, se cuantificaron por qRT-PCR en cada muestra individualmente los valores de expresión de ISG15 y de la nucleoproteína viral y se normalizaron con respecto a los valores obtenidos en unas células A549 infectadas con el VRSH que se utilizaron como control. Al igual que en los epitelios pseudoestratificados, los resultados obtenidos mostraron unos altos valores de correlación entre la expresión de ISG15 y la infección por el VRSH (Figura 24).

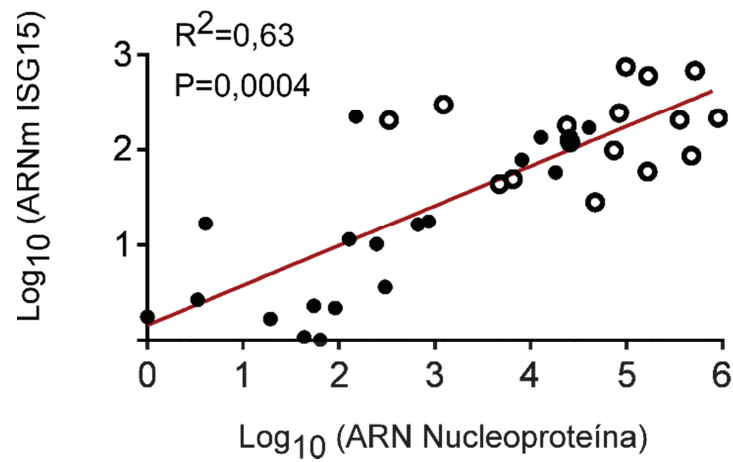


Figura 24. Regresión lineal entre ISG15 y la nucleoproteína viral en muestras de lavados nasofaríngeos de niños infectados con el VRSH. El eje de abscisas y de ordenadas representan el número de veces de expresión de la nucleoproteína viral e ISG15 respectivamente en relación a un control. Los puntos blancos representan muestras tomadas en el ingreso hospitalario y los puntos negros muestras tomadas en el alta.

Por tanto, estos resultados en su conjunto, demuestran que ISG15 se induce *in vivo* como consecuencia de la infección por el VRSH y sugieren que podría tener un papel antiviral en las infecciones naturales por este virus.

VI. DISCUSIÓN.

DISCUSIÓN.

Aunque la actividad antiviral de ISG15, tanto *in vitro* como *in vivo*, ha sido ampliamente descrita en numerosos virus [107, 108, 129-135], los mecanismos por los cuales esta molécula ejerce su función solo se han definido en algunos casos. Algunos de los procesos en los que ISG15 ejerce un efecto antiviral, tienen lugar en etapas tardías de la replicación viral. Por ejemplo, ISG15 está implicado entre otros en la inhibición de la liberación de los virus ébola y VIH de las células infectadas [129, 130]. Por el contrario, se ha descrito recientemente que ISG15 inhibe etapas tempranas del ciclo viral del norovirus murino como la entrada a la célula y/o la liberación al citoplasma, aunque de momento no se han identificado las proteínas diana responsables [147]. La acción antiviral de ISG15 puede estar mediada por la molécula en su forma libre [131], o bien puede ser debida a la conjugación de ésta con proteínas diana específicas [128]. En lo que se refiere a las proteínas diana, se ha descrito que ISG15 puede conjugarse tanto con proteínas virales como con proteínas celulares. Por ejemplo, la ISGilación de la proteína NS1 del virus Influenza A reduce la capacidad de esta proteína de contrarrestar la respuesta antiviral [124], mientras que en infecciones por el virus Sendai la ISGilación del factor de transcripción celular IRF3, implicado en la transcripción de genes antivirales, estabiliza la proteína e impide su degradación en el proteosoma aumentando así la respuesta antiviral [128].

1. Inducción de ISG15 por el VRSH y su papel antiviral.

Nuestros resultados muestran que a pesar de que la infección *in vitro* por el VRSH induce grandes cantidades de ISG15, así como de las enzimas implicadas en el proceso de ISGilación (Ube1L, UbcH8 y HERC5), no se observa la aparición de conjugados de ISG15 hasta tiempos muy tardíos de la infección y no se aprecia la existencia de un efecto antiviral. Sin embargo, este efecto sí se hace patente cuando ISG15 se encuentra en grandes cantidades y la maquinaria de ISGilación está activa antes de la infección, como sucede cuando se estimulan las células previamente con INF- β o se sobreexpresa ISG15 mediante plásmidos. Cabe señalar, que aunque en algunos casos se

requiere la sobreexpresión adicional de las enzimas tipo E1, E2 y E3 conjuntamente con ISG15 para detectar ISGilación de proteínas, en nuestro sistema, la sola transfección de ISG15 induce también una ligera sobreexpresión de esas enzimas y la formación de conjugados. En cualquier caso, los resultados obtenidos tanto con IFN- β como con la expresión de ISG15 mediante plásmidos indican claramente que el momento en que se expresa ISG15 con respecto a la infección es fundamental para su efecto antiviral.

Aunque el efecto inhibitor de ISG15 frente al VRSH es moderado, entre 5 y casi 10 veces de variación en el título viral, dependiendo de la multiplicidad de infección, nuestros resultados coinciden con los descritos en otros virus en infecciones *in vitro*, ya que en la mayoría de los casos el efecto sobre la replicación viral varía entre 5 y 20 veces [107]. Por ejemplo, se observó que el silenciamiento de ISG15 en células A549 aumentó en cinco veces la infectividad del virus Influenza A [148], mientras que la sobreexpresión de ISG15 produjo una disminución del título viral de diez veces en células 293T infectadas con el virus de la estomatitis vesicular [130]. Estos resultados son consistentes con la idea de que en la respuesta antiviral, en la que están involucradas centenares de proteínas, cada una de ellas contribuye de forma proporcional al desarrollo de una potente respuesta conjunta.

2. Relación entre la acción antiviral de ISG15 y el momento de su expresión en la infección por VRSH.

Puesto que la ISGilación es una modificación que ocurre simultáneamente a la traducción [122], es posible que la acción antiviral de ISG15 frente al VRSH sea debida a la ISGilación de proteínas virales y/o celulares esenciales para la replicación del virus. Debido a que la acumulación de ISG15 durante la infección por el VRSH va retrasada con respecto a la acumulación de proteínas virales, una posible explicación de por qué sólo se aprecia el efecto antiviral de ISG15 si los niveles de esta proteína en la células son altos antes de iniciarse la infección sería la siguiente: el efecto antiviral de ISG15 se debería a la ISGilación de las propias proteínas virales, de manera que en las primeras células infectadas por el VRSH, ISG15 no tendría efecto puesto que la mayoría de estas proteínas se habrían acumulado a unos niveles

suficientemente altos antes de que el proceso de ISGilación estuviera activo. Sin embargo, en las células en las que se ha adquirido un estado antiviral previo a la infección, como aquellas estimuladas por interferón, los niveles de ISG15 serían altos y la maquinaria de ISGilación estaría lista para actuar tan pronto como el virus las infectara, e ISG15 podría conjugarse con sus proteínas diana para inhibir la replicación viral.

El hecho de que ISG15 tenga un efecto negativo en la acumulación de ARN y proteínas virales, indica que podría estar afectando a proteínas celulares o virales implicadas en los procesos de replicación y/o transcripción del ARN, siendo las proteínas virales P, L, M2-1, M2-2 y N claras candidatas para su estudio. Otras proteínas estructurales del VRSH podrían ser también diana de ISG15. La ISGilación de sólo una pequeña fracción de proteínas estructurales puede tener un gran efecto en la producción final de virus infectivos, como se ha demostrado en el virus del papiloma humano donde la ISGilación del 10% de la proteína L1 de la cápside durante la replicación, hace disminuir en un 70% su infectividad [122]. En ensayos preliminares, se ha observado por western blot que, además de la banda correspondiente a la nucleoproteína, que aparece tanto en células ISG15^{+/+} como ISG15^{-/-} infectadas con el VRSH y tratadas previamente con IFN- β , en las células ISG15^{+/+} y no en las ISG15^{-/-} se aprecian además unas bandas minoritarias de mayor peso molecular que podrían corresponder a formas ISGiladas de esta proteína, aunque para confirmar esta hipótesis es necesario realizar experimentos adicionales.

De manera alternativa o simultáneamente a lo descrito con anterioridad, algunas proteínas del VRSH podrían contrarrestar la acción de ISG15. Esto, como se ha comentado con anterioridad, se ha descrito en el virus influenza B donde la proteína NS1 se une a ISG15 impidiendo su activación [110], o en el virus vaccinia, donde la proteína E3L impide la formación de conjugados mediante la unión a ISG15 [140]. Si algo similar sucediera durante la infección por el VRSH, y existieran proteínas virales capaces de unirse a ISG15 para inhibir su función, en el momento en el que ISG15 alcanzase unos niveles suficientes de expresión para conjugarse a sus proteínas diana, las proteínas virales ya habrían alcanzado previamente niveles suficientes como para ejercer su función antagonista. Por el contrario, si los niveles de ISG15 son elevados

en el momento de la infección, no existirían proteínas virales suficientes con la capacidad de inhibir su función. Esto podría ser aplicable a cualquiera de las enzimas implicadas en el proceso de ISGilación en lugar de a ISG15 directamente. En el caso del VRSH, las proteínas no estructurales NS1 y NS2, involucradas en la evasión del sistema inmune innato de la célula [41], podrían ser candidatas a ejercer algún tipo de función frente a ISG15. De hecho, la inhibición por parte de estas proteínas de la respuesta a interferón, podría ser en parte responsable del retraso de la acumulación de ISG15 y de la formación de conjugados observada con respecto a la replicación del VRSH.

Finalmente, el hecho de que existan distintos patrones de ISGilación entre las células infectadas con el VRSH y las células tratadas con interferón, podrá ayudar en estudios posteriores a la identificación de las proteínas diana de ISG15 específicas de cada tratamiento y determinar si la ISGilación de alguna de esas proteínas contribuye a restringir la replicación del virus.

3. La ISGilación como mecanismo de acción frente al VRSH.

Nuestros resultados muestran que la actividad antiviral de ISG15 frente al VRSH es debida a procesos de ISGilación. En primer lugar, la sobreexpresión de una forma mutada de ISG15 incapaz de conjugarse a proteínas diana no tuvo efecto antiviral. En segundo lugar, el silenciamiento de UbE1L, una enzima indispensable para el proceso de ISGilación, dio lugar a un aumento en el título del VRSH. Por último, el silenciamiento de USP18, una isopeptidasa que revierte el proceso de ISGilación, tuvo el efecto contrario al silenciamiento de UbE1L, disminuyendo el título viral.

Además, e independientemente de su función isopeptidasa, USP18 es capaz de regular negativamente la ruta del interferón α/β mediante la competición con JAK1 para unirse con el receptor de interferón IFNAR2 [121]. Esta regulación es dependiente de la estabilización de USP18 por parte de ISG15 evitando su degradación en el proteosoma. Este proceso es independiente de ISGilación puesto que no se ve afectado por la falta de UbE1L y porque la proteína ISG15 mutada, incapaz de conjugarse a proteínas diana, sí es capaz de estabilizar USP18 [103] (Figura 25).

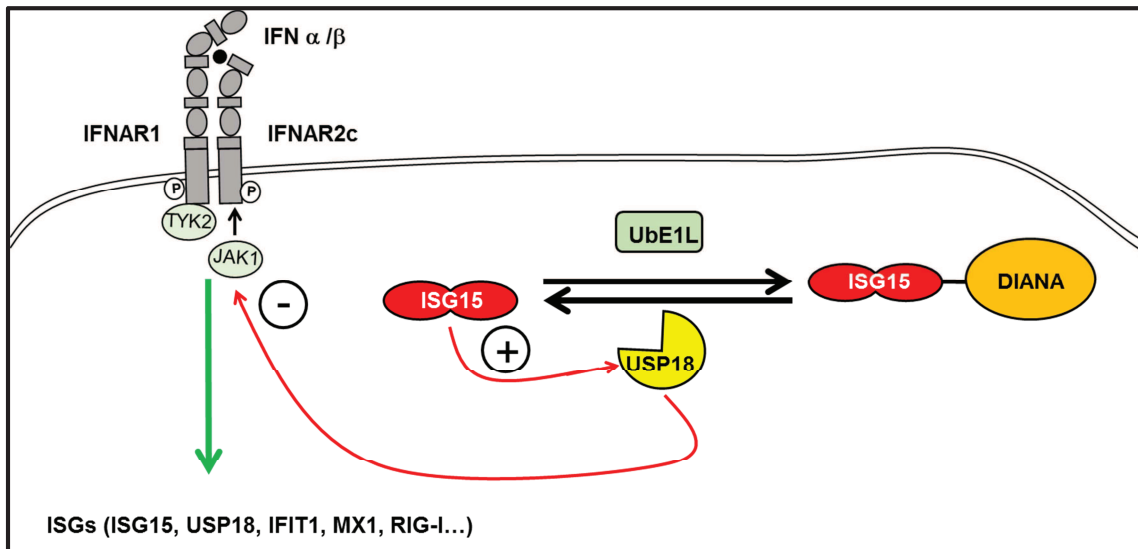


Figura 25. Representación esquemática de los mecanismos de acción dependientes e independientes de conjugación de ISG15 y su implicación en la regulación de la ruta del interferón.

Por lo tanto, existen dos mecanismos principales por los cuales ISG15 podría afectar a la replicación viral dentro de la célula. Uno de ellos es vía ISGilación de proteínas y otro a través de la estabilización de USP18 y su efecto en la señalización por IFN tipo I.

Según el segundo mecanismo, la falta de ISG15 tendría como resultado una mayor degradación de USP18 y una mayor activación de la ruta del interferón, con el consiguiente aumento de la respuesta antiviral y la expresión de ISGs (Figura 25). De acuerdo con esto, se observó un incremento de la expresión de los genes estimulados por interferón (ISGs) IFIT1 y RIG-I en las células silenciadas con ISG15 o USP18 respecto de las células control, aunque las diferencias no fueron significativas en la mayoría de los casos. Por el contrario, el silenciamiento de UbE1L produjo una reducción en la expresión de estos genes.

Sin embargo, los resultados de este trabajo, muestran que el efecto antiviral de ISG15 está mediado por procesos de ISGilación más que por su acción estabilizadora de USP18. En primer lugar, aunque la proteína ISG15 no conjugante tiene capacidad de estabilizar USP18 [103], los experimentos de sobreexpresión con esta proteína no mostraron ningún efecto sobre la replicación viral. En segundo lugar, el silenciamiento de UbE1L, y por tanto la

disminución de la ISGilación, en células tratadas con interferón produjo un aumento del título viral. Aunque nuestros resultados muestran una disminución de la respuesta a interferón que estaría a favor de una mayor replicación viral en células silenciadas para UbE1L, estudios anteriores describen la falta de efecto del silenciamiento de este gen sobre la estabilización de USP18 [103]. En tercer lugar, aunque nuestros resultados muestran que el silenciamiento de ISG15 y UbE1L tienen efectos contrarios sobre la expresión de los genes RIG-I e IFIT1, en ambas situaciones aumenta la replicación viral en presencia de IFN- β . Por último, aunque los silenciamientos de USP18 o ISG15 aumentan la expresión de IFIT1 y RIG-I, los efectos son opuestos con respecto a la replicación viral, la falta de ISG15 aumenta el título del VRSH, mientras que la de USP18 lo disminuye. Si el papel de ISG15 como estabilizador de USP18 fuera relevante en el contexto de la infección por el VRSH, el silenciamiento de este gen tendría como resultado una disminución del título viral como ocurre cuando se silencia USP18. Estos resultados indican que la función isopeptidasa de USP18 frente a ISG15, revirtiendo los procesos de ISGilación, es más importante que su papel como regulador negativo de la señalización por IFN- α/β en lo que respecta a la replicación del VRSH. Sin embargo, no se puede descartar totalmente que el mecanismo de estabilización de USP18 pueda tener también algún efecto menor en la replicación viral. Nuestros resultados coinciden con los descritos recientemente en los que se muestra que la inactivación selectiva de la función isopeptidasa de USP18 en ratones de experimentación aumenta la ISGilación y la resistencia frente a la infección con los virus vaccinia e influenza B. Estos resultados se obtuvieron sin observar cambios en la señalización de la ruta del interferón [120].

4. Acción de ISG15 en las etapas del ciclo viral.

Se han descrito varios ejemplos de virus en los que ISG15 inhibe la liberación de los viriones de las células infectadas. Entre estos virus, se encuentran el VIH [129, 139], el virus de la leucosis del sarcoma aviar [149], el virus ébola [130] o el virus del dengue [135]. Además, también se ha descrito el papel de ISG15 como inhibidor de la entrada a la célula y/o la liberación al citoplasma durante la infección por el norovirus murino [147].

Nuestros resultados han determinado que el efecto antiviral de ISG15 frente el VRSH es posterior a la entrada del virus en la célula. Se observó que en condiciones de infección a una alta multiplicidad, en la que se produce una sola ronda de replicación del VRSH, en células con sobreexpresión de ISG15 las diferencias en la acumulación del ARNv con respecto a las células control no fueron patentes hasta las 16 horas post-infección. Además, también se ha determinado que no existe una implicación de esta molécula en la liberación del virus. Si ISG15 impidiera la liberación del VRSH, la cantidad de virus asociado a la membrana o en el interior celular sería mayor en las células en las que se sobreexpresa ISG15 que en las células control. El hecho de que el título viral disminuya en las células con sobreexpresión de ISG15 tanto en la fracción de virus liberado como en la de virus asociado a la célula indica que este paso no se ve afectado.

Por lo tanto, la acción de ISG15 frente al VRSH tiene lugar en una etapa posterior a la entrada del virus a la célula pero anterior a su liberación. El hecho de que el efecto antiviral de ISG15 de lugar a una disminución en la acumulación de ARN del VRSH, sugiere que la replicación/transcripción del virus podría estar afectada, aunque para confirmar esta hipótesis es necesario realizar experimentos adicionales.

5. Posible papel *in vivo* de ISG15.

Aunque el VRSH es capaz de infectar animales de experimentación como ratas, ratones, conejillos de indias o chimpancés, sólo este último reproduce con fidelidad las condiciones de la infección que se producen en humanos [12]. Por lo tanto, la obtención de datos *in vivo* sobre la interacción del VRSH con su hospedador está muy limitada ética y económicamente.

La correlación positiva que se describe en este trabajo entre la infección por el VRSH y la expresión de ISG15 en epitelios pseudoestratificados y en lavados nasofaríngeos procedentes de niños infectados, indica un probable papel de ISG15 en las infecciones por el VRSH *in vivo*. Debido a la replicación del VRSH en las células a las que infecta, se generan una serie de estructuras denominadas PAMPs, que tras ser reconocidas por los receptores celulares adecuados, desencadenan una serie de cascadas intracelulares de

señalización que en última instancia provocan la expresión de ISG15 junto con un gran número de genes antivirales y proinflamatorios que inician la respuesta inmune [74, 85]. En este escenario, las células epiteliales no infectadas podrían adquirir un estado antiviral gracias al interferón secretado por las células vecinas infectadas por el VRSH o por aquel secretado por las numerosas células del sistema inmune que acudirían al sitio de la infección [150, 151]. Este estado antiviral de las células epiteliales respiratorias implicaría que, en el momento de ser infectadas, los niveles de expresión de ISG15 serían lo suficientemente altos como para permitir ejercer su acción antiviral y jugar así un papel importante en la restricción de la diseminación de la infección por el VRSH. Además, la sobreexpresión de ISG15 también podría contribuir a evitar una excesiva inflamación durante la infección por el VRSH mediante la estabilización de USP18 y la consecuente regulación negativa de la señalización por interferón (Figura 25) [103].

El papel de ISG15 durante las infecciones virales *in vivo* parece ser complejo, y sus funciones pueden ser diversas dependiendo del organismo o los virus implicados. Esta complejidad ha quedado constatada mediante los datos contradictorios que se han obtenido en humanos y ratones deficientes en esta proteína. Se ha observado que mientras que la falta de ISG15 en ratones produce un aumento de la letalidad frente a infecciones con los virus influenza A, influenza B, sindbis o herpes en comparación con ratones silvestres [133], un reciente estudio ha propuesto que la falta de expresión de ISG15 en humanos podría ser la responsable de una mayor protección frente a las infecciones como consecuencia de la menor estabilidad de USP18 y una mayor respuesta al interferón [103]. Además, se acaba de proponer un nuevo mecanismo de protección *in vivo* de ISG15 frente a la infección por los virus Sendai e influenza A en ratones [152]. Este mecanismo dependiente de ISG15 no afectaría ni a la replicación de estos virus ni a la regulación del sistema inmune, como sucede durante las infecciones con los virus vaccinia o influenza B [120] y se propone que ISG15 podría tener un papel en la regeneración de los tejidos dañados que favorecería una menor letalidad [152].

La alta correlación existente entre la carga viral y la expresión de ISG15 en los niños infectados con el VRSH y el hecho de que esta molécula se secrete a los fluidos, donde puede ser cuantificada, podría abrir la posibilidad

para ser usada como un marcador de la inflamación producida por el VRSH [102]. De acuerdo con esto, en todas las muestras analizadas procedentes de los niños infectados, se observó que, para cada niño, el descenso de carga viral entre el ingreso y el alta se correlacionó fuertemente con un descenso similar de ISG15 en ese intervalo de tiempo, indicando que los niveles de ISG15 son un reflejo de ambos, inflamación y carga viral.

VII. CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

1. La infección por el VRSH en células A549 induce la expresión de ISG15, así como de las enzimas implicadas en el proceso de ISGilación, Ube1L, UbcH8 y HERC5, lo que da lugar a un patrón de ISGilación específico en las células infectadas que es diferente al inducido por interferón.
2. ISG15 tiene un efecto antiviral frente al VRSH cuando se expresa en altas cantidades y la maquinaria de ISGilación está activa antes de que se inicie la infección y afecta negativamente a la acumulación de ARN y proteínas virales, así como a la producción de virus infectivo.
3. El papel antiviral de ISG15 en el contexto de la infección *in vitro* por el VRSH es debido a procesos de ISGilación, más que a su actividad como regulador de la ruta del interferón.
4. La función antiviral de ISG15 frente al VRSH tiene lugar en etapas del ciclo viral posteriores a la entrada del virus en la célula y anteriores a su liberación.
5. La expresión de ISG15 correlaciona positivamente con la expresión de la nucleoproteína viral en epitelios respiratorios generados *in vitro* a partir de explantes de pulmones humanos y en lavados nasofaríngeos de niños infectados, por lo que podría tener un papel relevante en las infecciones por el VRSH *in vivo*.

VIII. REFERENCIAS.

REFERENCIAS.

1. Chanock, R., B. Roizman, and R. Myers, *Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization*. Am J Hyg, 1957. **66**(3): p. 281-90.
2. Wang, L.-F., Collins, P.L., Fouchier, R.A.M., Kurath, G., Lamb, R.A., Randall, R.E. and Rima, B.K., *Paramyxoviridae*, in *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, M.J.A. Andrew M.Q. King, Eric B. Carstens, and Elliot J. Lefkowitz, Editor 2012, Elsevier Academic Press: San Diego, CA. p. 672-685.
3. Coates, H.V., D.W. Alling, and R.M. Chanock, *An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test*. Am J Epidemiol, 1966. **83**(2): p. 299-313.
4. Anderson, L.J., et al., *Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies*. J Infect Dis, 1985. **151**(4): p. 626-33.
5. Mufson, M.A., et al., *Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1985. **66** (Pt 10): p. 2111-24.
6. Cane, P.A. and C.R. Pringle, *Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene)*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 2): p. 349-57.
7. Johnson, P.R., Jr., et al., *Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity*. J Virol, 1987. **61**(10): p. 3163-6.
8. Cristina, J., et al., *Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity*. Virology, 1990. **174**(1): p. 126-34.
9. Lamb, R.A. and G.D. Parks, *Paramyxoviridae*, in *Fields Virology*, P.M.H. David M. knipe, Editor 2013. p. 957-995.
10. Rudan, I., et al., *Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries*. J Glob Health, 2013. **3**(1): p. 010401.
11. Nair, H., et al., *Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis*. Lancet, 2010. **375**(9725): p. 1545-55.
12. Collins, P.L. and R.A. Karron, *Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus*, in *Fields Virology* P.M.H. David M. knipe, Editor 2013. p. 1087-1123.
13. Walsh, E.E. and A.R. Falsey, *Respiratory syncytial virus infection in adult populations*. Infect Disord Drug Targets, 2012. **12**(2): p. 98-102.
14. Falsey, A.R. and E.E. Walsh, *Respiratory syncytial virus infection in adults*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(3): p. 371-84.
15. White, L.J., et al., *The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England & Wales and Finland:*

- seasonality and cross-protection. *Epidemiol Infect*, 2005. **133**(2): p. 279-89.
16. Collins, P.L. and B.S. Graham, *Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis*. *J Virol*, 2008. **82**(5): p. 2040-55.
 17. Domachowske, J.B. and H.F. Rosenberg, *Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment*. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(2): p. 298-309.
 18. Wright, M. and G. Piedimonte, *Respiratory syncytial virus prevention and therapy: past, present, and future*. *Pediatr Pulmonol*, 2011. **46**(4): p. 324-47.
 19. Roymans, D. and A. Koul, *Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection: Past, Present and Future*. Human Respiratory Syncytial Virus Infection 2011.
 20. Welliver, R.C., Sr., *The immune response to respiratory syncytial virus infection: friend or foe?* *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008. **34**(2): p. 163-73.
 21. Sigurs, N., et al., *Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(2): p. 137-41.
 22. Everard, M.L., *The relationship between respiratory syncytial virus infections and the development of wheezing and asthma in children*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006. **6**(1): p. 56-61.
 23. Gil-Prieto, R., et al., *Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Children up to 5 Years of Age in Spain: Epidemiology and Comorbidities: An Observational Study*. *Medicine (Baltimore)*, 2015. **94**(21): p. e831.
 24. Pfeil, J., et al., *Screening for respiratory syncytial virus and isolation strategies in children hospitalized with acute respiratory tract infection*. *Medicine (Baltimore)*, 2014. **93**(25): p. e144.
 25. Salez, N., et al., *Prospective and retrospective evaluation of the Cepheid Xpert(R) Flu/RSV XC assay for rapid detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015. **81**(4): p. 256-8.
 26. Gomez, S., et al., *Evaluation of a new rapid diagnostic test for the detection of influenza and RSV*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2015.
 27. Collins, P.L. and B.R. Murphy, *Vaccines against Human Respiratory Syncytial Virus in Perspectives in Medical Virology*, P. Cane, Editor 2007. p. 233-278.
 28. Kapikian, A.Z., et al., *An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine*. *Am J Epidemiol*, 1969. **89**(4): p. 405-21.
 29. Teng, M.N., et al., *Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees*. *J Virol*, 2000. **74**(19): p. 9317-21.
 30. de Waal, L., et al., *Evaluation of BBG2Na in infant macaques: specific immune responses after vaccination and RSV challenge*. *Vaccine*, 2004. **22**(8): p. 915-22.
 31. Kohlmann, R., et al., *Protective efficacy and immunogenicity of an adenoviral vector vaccine encoding the codon-optimized F protein of respiratory syncytial virus*. *J Virol*, 2009. **83**(23): p. 12601-10.

32. Yu, J.R., et al., *Single intranasal immunization with recombinant adenovirus-based vaccine induces protective immunity against respiratory syncytial virus infection*. J Virol, 2008. **82**(5): p. 2350-7.
33. Connors, M., et al., *Resistance to respiratory syncytial virus (RSV) challenge induced by infection with a vaccinia virus recombinant expressing the RSV M2 protein (Vac-M2) is mediated by CD8+ T cells, while that induced by Vac-F or Vac-G recombinants is mediated by antibodies*. J Virol, 1992. **66**(2): p. 1277-81.
34. Ventre, K. and A.G. Randolph, *Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(1): p. CD000181.
35. Lanari, M., et al., *The Use of Humanized Monoclonal Antibodies for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**.
36. Huang, Y.T. and G.W. Wertz, *The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species*. J Virol, 1982. **43**(1): p. 150-7.
37. Mink, M.A., D.S. Stec, and P.L. Collins, *Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA*. Virology, 1991. **185**(2): p. 615-24.
38. Collins, P.L., et al., *Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5134-8.
39. Kuo, L., R. Fearn, and P.L. Collins, *Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 4944-53.
40. Elliott, J., et al., *Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3428-36.
41. Barik, S., *Respiratory syncytial virus mechanisms to interfere with type 1 interferons*. Curr Top Microbiol Immunol, 2013. **372**: p. 173-91.
42. Dupuy, L.C., et al., *Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8384-92.
43. Ghildyal, R., et al., *Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 4): p. 753-7.
44. Gan, S.W., et al., *The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels*. J Biol Chem, 2012. **287**(29): p. 24671-89.
45. Hallak, L.K., et al., *Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10508-13.
46. Martinez, I. and J.A. Melero, *Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 11): p. 2715-22.
47. Moore, E.C., J. Barber, and R.A. Tripp, *Respiratory syncytial virus (RSV) attachment and nonstructural proteins modify the type I interferon response associated with suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins and IFN-stimulated gene-15 (ISG15)*. Virol J, 2008. **5**: p. 116.

48. Bukreyev, A., et al., *The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on Fc receptor-bearing leukocytes*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12191-204.
49. Srinivasakumar, N., P.L. Ogra, and T.D. Flanagan, *Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay*. J Virol, 1991. **65**(8): p. 4063-9.
50. Walsh, E.E. and J. Hruska, *Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein*. J Virol, 1983. **47**(1): p. 171-7.
51. Collins, P.L., et al., *Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 81-5.
52. Bermingham, A. and P.L. Collins, *The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11259-64.
53. Liuzzi, M., et al., *Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 13105-15.
54. Feldman, S.A., R.M. Hendry, and J.A. Beeler, *Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6610-7.
55. Tayyari, F., et al., *Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1132-5.
56. Teng, M.N., S.S. Whitehead, and P.L. Collins, *Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo*. Virology, 2001. **289**(2): p. 283-96.
57. Dickens, L.E., P.L. Collins, and G.W. Wertz, *Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus*. J Virol, 1984. **52**(2): p. 364-9.
58. McGivern, D.R., P.L. Collins, and R. Fearn, *Identification of internal sequences in the 3' leader region of human respiratory syncytial virus that enhance transcription and confer replication processivity*. J Virol, 2005. **79**(4): p. 2449-60.
59. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
60. Martinez, I., et al., *Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 2): p. 570-81.
61. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
62. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
63. Tal, G., et al., *Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease*. J Infect Dis, 2004. **189**(11): p. 2057-63.

64. Douville, R.N., et al., *TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: no impact on human immune responsiveness to LPS or respiratory syncytial virus*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12087.
65. Paulus, S.C., et al., *Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms--role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance*. Clin Immunol, 2007. **123**(3): p. 252-7.
66. Liu, P., et al., *Retinoic acid-inducible gene 1 mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells*. J Virol, 2007. **81**(3): p. 1401-11.
67. Groskreutz, D.J., et al., *Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1733-40.
68. Rudd, B.D., et al., *Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3350-7.
69. Espinoza, J.A., et al., *Modulation of host adaptive immunity by hRSV proteins*. Virulence, 2014. **5**(7): p. 740-51.
70. Loo, Y.M. and M. Gale, Jr., *Immune signaling by RIG-I-like receptors*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 680-92.
71. Kato, H., et al., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1601-10.
72. Ling, Z., K.C. Tran, and M.N. Teng, *Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3734-42.
73. McNab, F., et al., *Type I interferons in infectious disease*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(2): p. 87-103.
74. Fensterl, V. and G.C. Sen, *Interferons and viral infections*. Biofactors, 2009. **35**(1): p. 14-20.
75. Jewell, N.A., et al., *Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza a virus in vivo*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 9790-800.
76. McIntosh, K., *Interferon in nasal secretions from infants with viral respiratory tract infections*. J Pediatr, 1978. **93**(1): p. 33-6.
77. Hall, C.B., et al., *Interferon production in children with respiratory syncytial, influenza, and parainfluenza virus infections*. J Pediatr, 1978. **93**(1): p. 28-32.
78. Gao, L., et al., *A randomized controlled trial of low-dose recombinant human interferons alpha-2b nasal spray to prevent acute viral respiratory infections in military recruits*. Vaccine, 2010. **28**(28): p. 4445-51.
79. Sung, R.Y., et al., *Treatment of respiratory syncytial virus infection with recombinant interferon alfa-2a*. Arch Dis Child, 1993. **69**(4): p. 440-2.
80. Swedan, S., et al., *Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location*. J Virol, 2011. **85**(19): p. 10090-100.
81. Lo, M.S., R.M. Brazas, and M.J. Holtzman, *Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 9315-9.

82. Spann, K.M., et al., *Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]*. J Virol, 2004. **78**(8): p. 4363-9.
83. Swedan, S., A. Musiyenko, and S. Barik, *Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways*. J Virol, 2009. **83**(19): p. 9682-93.
84. Schmid, S., et al., *Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral state*. J Biol Chem, 2010. **285**(53): p. 42013-22.
85. Sen, G.C. and S.N. Sarkar, *The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2007. **316**: p. 233-50.
86. Oshansky, C.M., et al., *The host response and molecular pathogenesis associated with respiratory syncytial virus infection*. Future Microbiol, 2009. **4**(3): p. 279-97.
87. Connors, M., et al., *Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1634-7.
88. Holberg, C.J., et al., *Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life*. Am J Epidemiol, 1991. **133**(11): p. 1135-51.
89. Prince, G.A., et al., *Effectiveness of topically administered neutralizing antibodies in experimental immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in cotton rats*. J Virol, 1987. **61**(6): p. 1851-4.
90. Graham, B.S., et al., *Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice*. J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 1026-33.
91. Chandwani, S., et al., *Respiratory syncytial virus infection in human immunodeficiency virus-infected children*. J Pediatr, 1990. **117**(2 Pt 1): p. 251-4.
92. Zhang, L., et al., *Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5654-66.
93. Everard, M.L., et al., *Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection*. Arch Dis Child, 1994. **71**(5): p. 428-32.
94. Alwan, W.H., F.M. Record, and P.J. Openshaw, *CD4+ T cells clear virus but augment disease in mice infected with respiratory syncytial virus. Comparison with the effects of CD8+ T cells*. Clin Exp Immunol, 1992. **88**(3): p. 527-36.
95. Farrell, P.J., R.J. Broeze, and P. Lengyel, *Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells*. Nature, 1979. **279**(5713): p. 523-5.
96. Dao, C.T. and D.E. Zhang, *ISG15: a ubiquitin-like enigma*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 2701-22.
97. Zhang, D. and D.E. Zhang, *Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(1): p. 119-30.
98. Narasimhan, J., et al., *Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27356-65.

99. Bogunovic, D., S. Boisson-Dupuis, and J.L. Casanova, *ISG15: leading a double life as a secreted molecule*. Exp Mol Med, 2013. **45**: p. e18.
100. Campbell, J.A. and D.J. Lenschow, *Emerging roles for immunomodulatory functions of free ISG15*. J Interferon Cytokine Res, 2013. **33**(12): p. 728-38.
101. Recht, M., E.C. Borden, and E. Knight, Jr., *A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma*. J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2617-23.
102. D'Cunha, J., et al., *In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 4100-8.
103. Zhang, X., et al., *Human intracellular ISG15 prevents interferon-alpha/beta over-amplification and auto-inflammation*. Nature, 2015. **517**(7532): p. 89-93.
104. Loeb, K.R. and A.L. Haas, *The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7806-13.
105. Knight, E., Jr., et al., *A 15-kDa interferon-induced protein is derived by COOH-terminal processing of a 17-kDa precursor*. J Biol Chem, 1988. **263**(10): p. 4520-2.
106. Lenschow, D.J., et al., *Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 13974-83.
107. Lenschow, D.J., *Antiviral Properties of ISG15*. Viruses, 2010. **2**(10): p. 2154-68.
108. Morales, D.J. and D.J. Lenschow, *The antiviral activities of ISG15*. J Mol Biol, 2013. **425**(24): p. 4995-5008.
109. Kim, K.I., et al., *Ube1L and protein ISGylation are not essential for alpha/beta interferon signaling*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(2): p. 472-9.
110. Yuan, W. and R.M. Krug, *Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein*. EMBO J, 2001. **20**(3): p. 362-71.
111. Zhao, C., et al., *The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(20): p. 7578-82.
112. Kim, K.I., et al., *Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9592-600.
113. Zou, W. and D.E. Zhang, *The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 3989-94.
114. Okumura, F., W. Zou, and D.E. Zhang, *ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP*. Genes Dev, 2007. **21**(3): p. 255-60.
115. Dastur, A., et al., *Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 4334-8.
116. Takeuchi, T., S. Inoue, and H. Yokosawa, *Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(2): p. 473-7.

117. Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe, *Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 550-63.
118. Catic, A., et al., *Screen for ISG15-crossreactive deubiquitinases*. PLoS One, 2007. **2**(7): p. e679.
119. Malakhov, M.P., et al., *UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9976-81.
120. Ketscher, L., et al., *Selective inactivation of USP18 isopeptidase activity in vivo enhances ISG15 conjugation and viral resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(5): p. 1577-82.
121. Malakhova, O.A., et al., *UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity*. EMBO J, 2006. **25**(11): p. 2358-67.
122. Durfee, L.A., et al., *The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15*. Mol Cell, 2010. **38**(5): p. 722-32.
123. Zhao, C., et al., *Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(29): p. 10200-5.
124. Zhao, C., et al., *ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 2253-8.
125. Zhao, C., et al., *Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus-host battle*. Trends Microbiol, 2013. **21**(4): p. 181-6.
126. Liu, X., et al., *Dynamic regulation of innate immunity by ubiquitin and ubiquitin-like proteins*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(6): p. 559-70.
127. Zou, W., et al., *ISG15 modification of ubiquitin E2 Ubc13 disrupts its ability to form thioester bond with ubiquitin*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(1): p. 61-8.
128. Shi, H.X., et al., *Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(10): p. 2424-36.
129. Okumura, A., et al., *Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1440-5.
130. Okumura, A., P.M. Pitha, and R.N. Harty, *ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3974-9.
131. Werneke, S.W., et al., *ISG15 is critical in the control of Chikungunya virus infection independent of Ube1L mediated conjugation*. PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002322.
132. Guerra, S., et al., *Vaccinia virus E3 protein prevents the antiviral action of ISG15*. PLoS Pathog, 2008. **4**(7): p. e1000096.
133. Lenschow, D.J., et al., *IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1371-6.
134. Ma, X.Z., et al., *Protein interferon-stimulated gene 15 conjugation delays but does not overcome coronavirus proliferation in a model of fulminant hepatitis*. J Virol, 2014. **88**(11): p. 6195-204.

135. Hishiki, T., et al., *Interferon-mediated ISG15 conjugation restricts dengue virus 2 replication*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **448**(1): p. 95-100.
136. Chen, L., et al., *ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 2): p. 382-8.
137. Broering, R., et al., *The interferon stimulated gene 15 functions as a proviral factor for the hepatitis C virus and as a regulator of the IFN response*. Gut, 2010. **59**(8): p. 1111-9.
138. Real, C.I., et al., *Identification of proteins that mediate the pro-viral functions of the interferon stimulated gene 15 in hepatitis C virus replication*. Antiviral Res, 2013. **100**(3): p. 654-61.
139. Pincetic, A., et al., *The interferon-induced gene ISG15 blocks retrovirus release from cells late in the budding process*. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4725-36.
140. Eduardo-Correia, B., et al., *ISG15 is counteracted by vaccinia virus E3 protein and controls the proinflammatory response against viral infection*. J Virol, 2014. **88**(4): p. 2312-8.
141. Frias-Staheli, N., et al., *Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(6): p. 404-16.
142. Kim, Y., et al., *A library of TAL effector nucleases spanning the human genome*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 251-8.
143. Garcia-Barreno, B., et al., *Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins*. J Virol, 1989. **63**(2): p. 925-32.
144. Martinez, I., J. Dopazo, and J.A. Melero, *Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 10): p. 2419-29.
145. Cortijo, J., et al., *Nickel induces intracellular calcium mobilization and pathophysiological responses in human cultured airway epithelial cells*. Chem Biol Interact, 2010. **183**(1): p. 25-33.
146. Liu, L.Q., et al., *A novel ubiquitin-specific protease, UBP43, cloned from leukemia fusion protein AML1-ETO-expressing mice, functions in hematopoietic cell differentiation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 3029-38.
147. Rodriguez, M.R., et al., *ISG15 functions as an interferon-mediated antiviral effector early in the murine norovirus life cycle*. J Virol, 2014. **88**(16): p. 9277-86.
148. Tang, Y., et al., *Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein*. J Immunol, 2010. **184**(10): p. 5777-90.
149. Kuang, Z., E.J. Seo, and J. Leis, *Mechanism of inhibition of retrovirus release from cells by interferon-induced gene ISG15*. J Virol, 2011. **85**(14): p. 7153-61.
150. Kohlmeier, J.E. and D.L. Woodland, *Immunity to respiratory viruses*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 61-82.
151. Goritzka, M., et al., *Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes*. J Exp Med, 2015. **212**(5): p. 699-714.

152. Morales, D.J., et al., *Novel mode of ISG15-mediated protection against influenza A virus and Sendai virus in mice*. J Virol, 2015. **89**(1): p. 337-49.

ISG15 is upregulated in respiratory syncytial virus infection and reduces virus growth through protein ISGylation.

González-Sanz R, Mata M, Bermejo-Martín J, Álvarez A, Cortijo J, Melero JA, Martínez I.

J Virol. 2016 Jan 13. pii: JVI.02695-15. PMID: 26763998

